Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden nach der Triestermethode

Darstellung von Teilsequenzen des terminalen Bereichs gengroßer DNA Moleküle von hypotrichen Ciliaten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heinz Rueß
aus Sigmaringen

1984

UNIV.
LEIDEN
ZOOL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536515_0009

Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden nach der Triestermethode

Darstellung von Teilsequenzen des terminalen Bereichs gengroßer DNA Moleküle von hypotrichen Ciliaten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Heinz Rueß
aus Sigmaringen

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 1984
Dekan: Professor Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Schott
2. Berichterstatter: Dozent Dr. H. Eckstein

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1981 bis September 1983 unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. H. Schott

am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Schott für die Stellung des Themas und für die rege Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Doz. Dr. H. Eckstein danke ich für die Durchführung des größten Teils der HPLC - Trennungen.

Dipl. Chem. Singhofer-Wowra danke ich für zwei von ihr durchgeführte HPLC - Trennungen.

Weiterhin gilt mein Dank Dipl. Chem. K. Cloß für zwei von ihm angefertigte Fingerprints.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die erhaltene Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
B.	PROBLEMSTELLUNG	10
C.	ALLGEMEINER TEIL	11
1.	Synthese der Oligodesoxyribonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	11
1.1.	Darstellung des Octanucleosidheptaphosphats $d(A_4C_4)$	11
1.2.	Darstellung des Dodecanucleosidundecaphosphats $d(C_4A_4C_4)$	32
1.3.	Darstellung des Hexadecanucleosidpentadecaphosphats $d(A_4C_4A_4C_4)$	36
1.4.	Synthese des Eikosanucleosidnonadecaphosphats $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	37
1.5.	Abspalten der Schutzgruppen	39
1.6.	Isolierung der synthetisierten Oligonucleosidphosphate	39
1.6.1.	Säulenchromatographische Reinigung mit RP - HPLC	40
1.7.	Identifizierung mit der Fingerprinttechnik	45
2.	Trägergebundene Synthese der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	53
2.1.	Einführung	53
2.2.	Voraussetzungen zur trägergebundenen Oligonucleotidsynthese im präparativen Maßstab	61
2.3.	Beladung von Polyvinylsuccinat-, Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid-, Polyacrylsäure-1-aminohexylamidgelen und derivatisierten Polyacrylsäure-1-aminohexylamidträgern mit Monomerbausteinen	62
2.4.	Durchführen von Testkondensationen	68
2.5.	Synthese der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ an Polyvinylsuccinat	69
2.5.1.	Entfernen der Schutzgruppen, Abspalten der Oligonucleosidphosphate vom Träger	77

2.6.	Reinigen der entschützten Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	77
2.6.1.	Papierchromatographische Vorreinigung	77
2.6.2.	HPLC an Partisil 10 - SAX und Nucleosil 7 C_{18}	77
2.7.	Identifizierung der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	84
D.	EXPERIMENTELLER TEIL	90
1.	Allgemeines	90
1.1.	Geräte	90
1.2.	Materialien	91
1.3.	Puffer	93
1.4.	Papierchromatographie	93
1.5.	Dünnschichtchromatographie	93
1.6.	Säulenchromatographie an Kieselgelsäulen	93
1.7.	Allgemeines zur trägergebundenen Synthese von Oligodesoxyribonucleosidphosphaten	94
2.	Einführen der Schutzgruppen	94
2.1.	N^4 - Anisoyldesoxyribocytidin	94
2.2.	N^6 - Benzoyldesoxyriboadenosin	95
2.3.	MeOTrOdanC, $(MeO)_2$TrOdanC und $(MeO)_2$TrOdbzA	96
2.3.1.	$(MeO)_2$TrOdT	96
2.4.	Darstellung von $(MeO)_2TrOdanC^{\ominus}\ Ba^{2+}_{0,5}$, $MeOTrOdanC^{\ominus}Ba^{2+}_{0,5}$, $(MeO)_2TrOdbzA^{\ominus}\ Ba^{2+}_{0,5}$, und $(MeO)_2TrOdT^{\ominus}\ Ba^{2+}_{0,5}$ aus $(MeO)_2$TrOdanC, MeOTrodanC, $(MeO)_2$TrOdbzA und $(MeO)_2$TrOdT	97
2.5.	N^4-Anisoyl-3'-O-benzoyldesoxyribocytidin	97
3.	Kondensation der geschützten Nucleotide	98
4.	Cyanoethylierung	98
5.	Darstellung von 5'OH-Komponenten durch Detritylierung	99
6.	Decyanoethylierung	100

7.	Entfernen der Schutzgruppen bei in Lösung synthetisierten Oligonucleosidphosphaten	100
8.	Säulenchromatographische Trennung der teilweise oder vollständig entschützten Oligonucleosidphosphate $(MeO)_2TrOd(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$ und $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$	100
8.1.	Aufarbeitung der von den QAE Säulen eluierten Peakfraktionen	101
9.	Trägergebundene Darstellung von Oligonucleosidphosphaten	102
9.1.	Veresterung des ersten Monomerbausteins $(MeO)_2TrOdN$ an die Trägermatrix	102
9.2.	Bestimmung des Reaktionsumsatzes bei der trägergebundenen Synthese	102
9.3.	Kettenverlängerung am Träger	106
9.4.	Entschützen und Abspalten der Oligonucleosidphosphate vom Träger	106
10.	Reinigung synthetischer Oligonucleosidphosphate mit Hilfe der HPLC	106
10.1.	Säulenchromatographie an Partisil 10 - SAX	108
10.1.1.	$d(A_4C_4)$ und $d(C_2A_4C_4)$ aus trägergebundener Synthese	108
10.1.2.	$d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ aus trägergebundener Synthese	108
10.2.	Chromatographie an reverser Phase mit Nucleosil 7 µm C_{18}	108
10.2.1.	$d(A_4C_4)$ und $d(C_2A_4C_4)$ aus trägergebundener Synthese	108
10.2.2.	$d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ aus trägerfreier Synthese	110
11.	Identifizierung der synthetischen Oligonucleosidphosphate	110
11.1.	Ansatz zur Kinasereaktion	110
11.2.	Homomixe	110
11.3.	Partialabbau mit Phosphodiesterase	112
E.	DISKUSSION	113
F.	ZUSAMMENFASSUNG	115
G.	LITERATURVERZEICHNIS	116

ABKÜRZUNGEN

$(MeO)_2Tr$	Dimethoxytrityl-
MeOTr	Monomethoxytrityl-
bz	Benzoyl- (Basenschutzgruppe)
Bz	Benzoyl- (Schutzgruppe der 3'Hydroxylgruppe)
an	Anisoyl-
ibu	Isobutyryl-
CNET	Cyanoethyl-
º	p- oder o-Chlorphenyl- geschützter 3'-5' Phosphodiester
Et	Ethyl-
TS	p-Toluolsulfonsäurechlorid
MS	2,4,6-Trimethylbenzolsulfonsäurechlorid
TPS	2,4.6-Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid
TSNI	p-Toluolsulfonylnitroimidazol
MSNT	Mesitylensulfonylnitrotriazol
PCP	Pentachlorphenol
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
TEA	Triethylamin
DTE	Dithioerithrit, Cleland's-Reagenz
Ci	Curie
v	Volumen
h	Stunde
U	Unit
cpm	Counts pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
QAE	Diethyl(2-hydroxypropyl)aminoethyl-
DEAE	Diethylaminoethyl-
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
d. Th.	der Theorie
RP	Reversed-Phase
PVAL	Polyvinylsuccinat
I. D.	Innendurchmesser
DC	Dünnschichtchromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolett

1 A_{260}-Einheit ist die Menge bei 260 nm absorbierenden Materials, die, gelöst in 1 ml, eine Extinktion von 1 hat.

Bei Abkürzungen der Nucleoside und Nucleotide werden IUPAC-IUB Regeln befolgt (Eur. J. Biochem. 15, 203 (1970).

A. EINLEITUNG

Alle gengroßen Moleküle im vegetativen Makronucleus von hypotrichen Ciliaten enden mit der "inverted repeat" Sequenz

$$5'd(G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4)$$
$$3'd(C_4A_4C_4A_4C_4)$$

Die Sequenz läßt eine molekularbiologische Schlüsselfunktion vermuten und soll sich möglicherweise auch in ihrer räumlichen Struktur von den bisher bekannten DNA Strukturen unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wird die chemische Synthese der Teilsequenzen $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ dieser terminalen "inverted repeat" Sequenz beschrieben, die sowohl für molekularbiologische Untersuchungen als auch für die Röntgenstrukturanalyse verwendet werden sollen. Die chemische Synthese ist erforderlich, da die benötigten Oligonucleotide durch Klonierung unzugänglich sind. Ein käuflicher Erwerb dieser Oligonucleotide in den geforderten Mengen (>20 mg) wäre außerdem, falls überhaupt möglich, heutzutage praktisch unbezahlbar.

Die chemische Synthese von Oligonucleotiden wird derzeit sowohl nach der Triester- als auch Phosphoamiditmethode durchgeführt. Die verschiedenen Methoden, die zur Oligonucleotidsynthese entwickelt wurden, sind in mehreren Übersichten zusammengefaßt [1-4]. Für die Darstellung größerer Mengen (>20 mg), die in der vorliegenden Arbeit synthetisiert werden sollen, scheidet die Phosphoamiditmethode aus, da sie als trägergebundenes Verfahren nur für Mengen bis ca. 1 mg konzipiert ist[4]. Für die Synthese wird somit die Triestermethode in Lösung gewählt, da die trägergebundene Variante dieser Methode ebenfalls nur für kleinere Mengen ausgearbeitet ist.

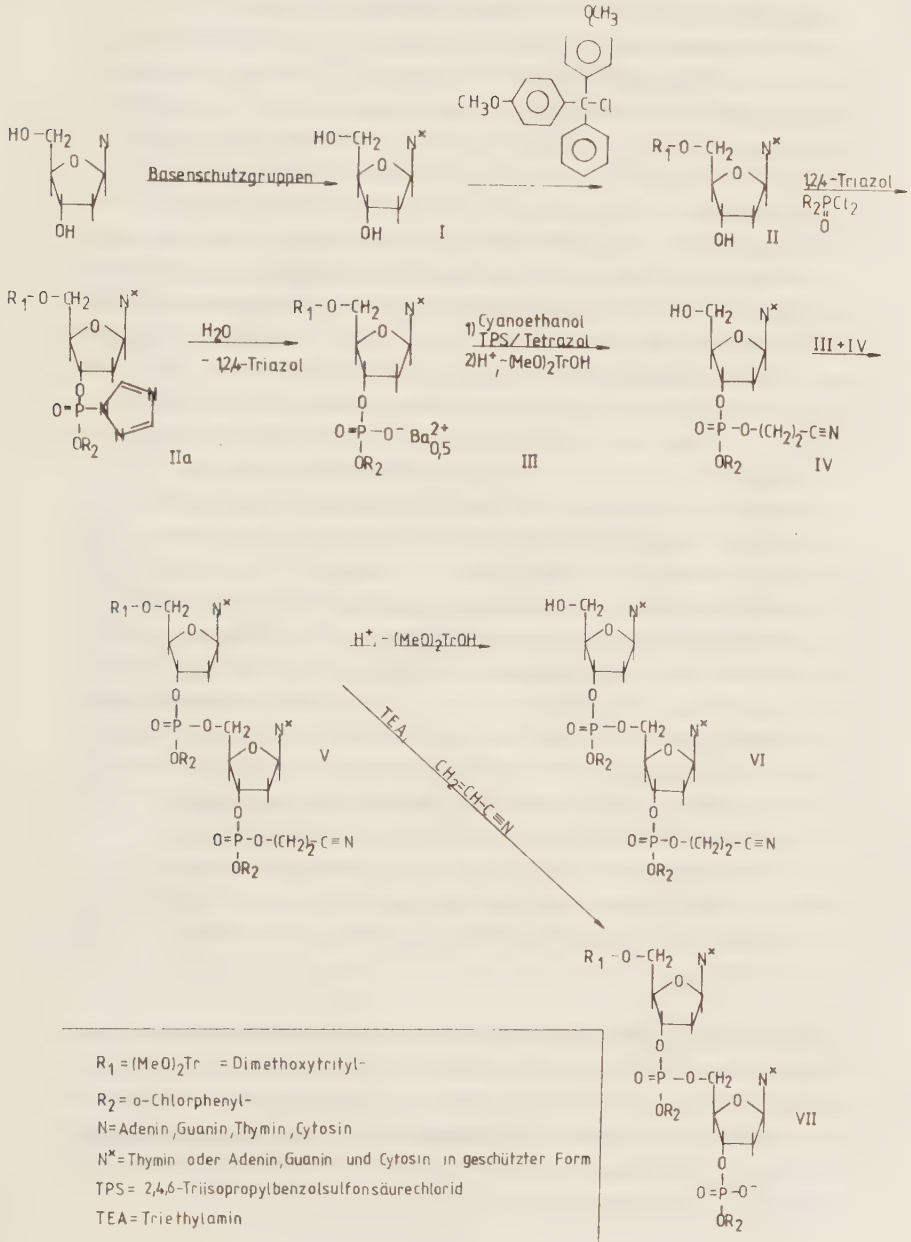
Die Triestermethode basiert auf folgendem Konzept. Käufliche Nucleoside werden gezielt mit Schutzgruppen versehen, in Phosphodiesterderivate überführt, die anschließend zu Phosphotriesterderivaten kondensiert werden. Nach der Kondensation werden die Schutzgruppen entfernt und das Reaktionsgemisch chromatographisch gereinigt.

Während Oligonucleotide bis etwa zur Kettenlänge 15 relativ problemlos mit den zur Verfügung stehenden chromatographischen Methoden (Papierchromatographie, HPLC, Gelelektrophorese) zu reinigen sind, können bei längeren Ketten diese Methoden nur mehr bedingt angewendet werden.

Phosphotriestermethode

Die Syntheseschritte sind in Schema 1 zusammengefaßt. Die Synthese beginnt mit dem Einführen der Schutzgruppen. In der Regel wird zuerst die funktionelle Aminogruppe in 6 - Stellung der heterocyclischen Base der Nucleoside Adenosin, Guanosin und in 4 - Stellung des Cytidins blockiert. Adenosin wird mit einer Benzoyl-, Guanosin mit einer Isobutyryl-, Cytidin mit einer Anisoylschutzgruppe versehen in dem das Nucleosid mit Benzoyl-, Isobutyryl- oder Anisoylchlorid umgesetzt wird. Die zu schützende Aminogruppe wird hierdurch in das entsprechende Säureamid überführt. Gleichzeitig werden die 5'- und 3'-Hydroxylgruppen der mit dem Heterocyclus N - glycosidisch verbundenen Desoxyribose verestert. Anschließend werden die Esterbindungen durch 1 M Natronlauge selektiv gespalten. Man erhält N^6 - Benzoyldesoxyriboadenosin, N^6 - Isobutyryldesoxyriboguanosin und N^4 - Anisoyldesoxyribocytidin (I). Durch Umsetzung der mit Basenschutzgruppen versehenen Desoxyribonucleoside (vgl. I⟶II, Schema 1) mit Dimethoxytritylchlorid [$(MeO)_2TrCl$] wird die 5'Hydroxylgruppe der Desoxyribose blockiert (II).

Schema 1: Triestermethode in Lösung



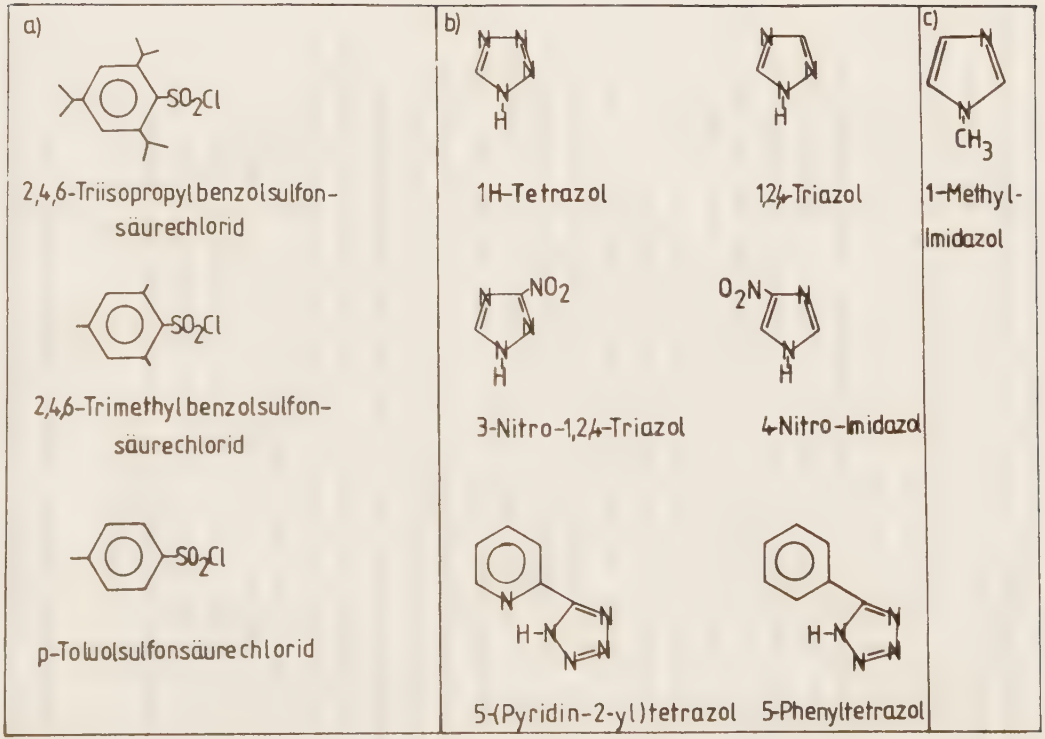
Die bei Blockierung der 5'Hydroxylgruppe ebenfalls mögliche Reaktion des Dimethoxytritylchlorids mit der freien 3'Hydroxylgruppe tritt nur als Nebenreaktion geringfügig auf. Die 5'Hydroxylgruppe setzt sich als primäre alkoholische Hydroxylgruppe bevorzugt um gegenüber der sterisch behinderten sekundären 3'alkoholischen Hydroxylgruppe.

In einem Zweistufenprozess (II→III, vgl. Schema 1) wird die verbliebene 3'Hydroxylgruppe unter gleichzeitiger Einführung der Phosphatschutzgruppe (o-Chlorphenyl-) phosphoryliert [5]. Hierzu wird zuerst o-Chlorphosphorodichloridat in Gegenwart von Triethylamin mit 1, 2, 4 - Triazol umgesetzt. Es entsteht o-Chlorphosphoroditriazolid.
Das entstandene Triethylammoniumhydrochlorid wird entfernt. In der zweiten Stufe setzt man o-Chlorphosphoroditriazolid mit der 3'Hydroxylgruppe von II um. Das entstandene Monotriazolid (II a) wird hydrolysiert und anschließend durch Eintropfen in 1 %iges wässriges $BaCl_2$ als Bariumsalz gefällt. Statt dem Bariumsalz [5] verwenden andere Autoren das Triethylammoniumsalz [6,7]. III ist eine Ausgangsverbindung für die Oligodesoxyribonucleotidsynthese nach der Triestermethode und wird im folgenden als monomere Phosphatkomponente bezeichnet. Eine weitere Ausgangsverbindung entsteht aus III in dem mit Hilfe eines Kondensationsmittels die freie Phosphatfunktion zunächst cyanoethyliert wird. Der entstandene vollgeschützte Triester wird nicht isoliert, sondern anschließend mit Benzolsulfonsäure (2 %ige Lösung in Chloroform/Methanol) detrityliert. Die erhaltene Komponente IV wird an Kieselgel chromatographiert und im folgenden als monomere 5'OH-Komponente bezeichnet.

Die monomere Phosphatkomponente III und die monomere 5'OH-Komponente IV können mit Hilfe eines Kondensationsmittels durch Knüpfung einer 3'— 5'Triesterbindung zum vollgeschützten Dinucleotid V kondensiert werden. Die Reinigung des Kondensationsgemisches wird, wie in der Triestermethode üblich, an Kieselgelsäulen durchgeführt.

Man hat in der Triestermethode heute eine Vielzahl von Kondensationsmitteln zur Verfügung. Die derzeit am häufigsten verwendeten sind 2,4,6 - Triisopropylbenzolsulfonsäuretetrazolid [8,9], 2,4,6 - Trimethylbenzolsulfonylnitrotriazolid [10] und 2,4,6 - Triisopropylbenzolsulfonylnitrotriazolid [11]. Gängige Kondensationsmittel sind weiterhin Mesitylensulfonyltetrazolid [8] und p-Toluolsulfonylnitroimidazol [5]. Eine Übersicht bietet Schema 2. Durch Reaktion eines Sulfonsäurechlorids aus Spalte a) (vgl. Schema 2) mit einem sekundären Amin der Spalte b) erhält man ein Kondensationsmittel. Durch Umsetzung von 5 - (Pyridin - 2 - yl) - Tetrazol oder 5 - Phenyltetrazol mit TPS oder MS erhält man erst in neuerer Zeit eingeführte Kondensationsmittel [12]. Die neueste Entwicklung stellt eine Mischung aus TPS und Methylimidazol aus Spalte c) dar [13]. Dieses Kondensationsmittel bietet zwei Vorteile. Man erhält es zum einen durch einfaches Mischen zweier stabiler Komponenten, zum anderen dauert die Kondensation nur ca. 30 min. Andere Kondensationsmittel erfordern längere Reaktionszeiten (60 - 90 min) und werden aufwendig durch die erwähnte Umsetzung dargestellt. Darüberhinaus sind sie nur begrenzt (ca. 10 Tage) haltbar. Auf Grund eines Berichtes von Jay [14] ist es ebenfalls möglich, die Verbindungen aus Spalte a) und b) des Schemas 2 zu mischen und als Kondensationsmittel einzusetzen, wobei die Kondensationsdauer ca. 60 min beträgt. Da jeder Autor mit "seinem" Kondensationsmittel Ausbeuten um ca. 90 % erreicht haben will, muß der eigene Laborversuch mitentscheiden, welches Kondensationsmittel in Frage kommt. Die Reaktionsmechanismen der Kondensation sind beschrieben [14].

Das Dinucleotid (vgl. Schema 1) kann entweder nach Detritylierung als oligomere 5'OH-Komponente VI oder nach Decyanoethylierung mittels Pyridin/Triethylamin 1:1 (v/v) als oligomere Phosphatkomponente VII zum Aufbau längerer Oligonucleosidphosphate eingesetzt werden.



Schema 2: Reagenzien, die nach Reaktion einer Komponente aus Spalte a) mit einer aus Spalte b) oder nach Mischen einer Komponente aus a) mit einem Reagenz aus b) oder c) als Kondensationsmittel eingesetzt werden können.

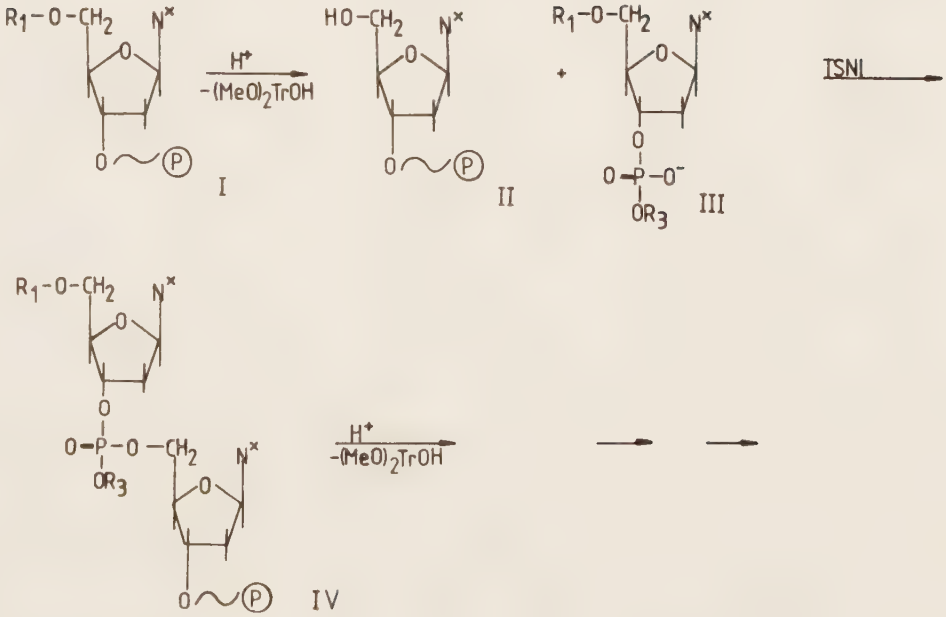
Zur Durchführung einer Oligodesoxyribonucleotidsynthese mit der Triestermethode, deren Endergebnis ein Oligonucleotid mit freien 3'- und 5'Hydroxylgruppen ist, werden zwei weitere Schutzgruppen benötigt. Die 5'Hydroxylgruppe des 5'terminalen Nucleosids der geplanten Sequenz wird mit der stabileren Monomethoxytritylgruppe anstatt der Dimethoxytritylgruppe blockiert. Nach Entfernen aller übrigen Schutzgruppen kann somit das synthetische Oligonucleosidphosphat in seiner tritylierten Form vorgereinigt werden [15]. Das 3'endständige Nucleosid des geplanten Oligodesoxyribonucleotids wird an seiner 3'Hydroxylgruppe mit einer Benzoylschutzgruppe versehen, die mit den Basen- und Phosphatschutzgruppen wieder entfernt wird. Zur Darstellung des 3'benzoylierten Nucleosids wird die Komponente II (vgl. Schema 1) mit Benzoylchlorid umgesetzt und anschließend ohne Isolierung detrityliert. Purinderivate müssen zusätzlich an einer Kieselgelsäule chromatographiert werden. Das 3'benzoylierte Nucleosid wird ebenfalls als monomere 5'OH-Komponente zur Kondensation eingesetzt.

Die Vorzüge der Triestermethode in Lösung sind:
Nach jedem Kondensationsschritt erfolgt Reinigung des Syntheseprodukts an Kieselgel. Darüberhinaus können alle Zwischenprodukte papierchromatographisch nach Entfernen der abspaltbaren Schutzgruppen auf Einheitlichkeit geprüft werden.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Triestermethode in Lösung ist die langwierige chromatographische Reinigung der Kondensationsprodukte. Zur Vereinfachung der Methode, wurde die trägergebundene Variante eingeführt, die wie folgt durchgeführt wird (vgl. Schema 3).

Die Synthese am Träger beginnt mit der Immobilisierung des 3'terminalen Monomerbausteins des aufzubauenden Oligonucleotids.

Schema 3: Trägergebundene Triestermethode



Abkürzungen vgl. Schema 1, zusätzlich: R_3 = p-Chlorphenyl- ,

TSNI = p-Toluolsulfonylnitroimidazol, Ⓟ = Träger, ∼ = Ankergruppe

Das geschützte Nucleosid II (vgl. Schema 1) wird hierbei über seine freie 3'Hydroxylgruppe an die Trägermatrix verestert (vgl. I Schema 3) und anschließend detrityliert. Die immobilisierte 5'OH-Komponente II wird nach Zugabe eines Kondensationsmittels mit der monomeren Phosphatkomponente III umgesetzt. Das geschützte Dinucleosidmonophosphat IV am Träger kann nach Detritylierung entweder mit oligomeren Phosphatkomponenten (vgl. VII Schema 1) oder monomeren Phosphatkomponenten verlängert werden, je nachdem ob eine Block- oder Monomeraddition durchgeführt wird. Aus dieser Beschreibung folgt, daß die Oligonucleotidkette am Träger vom 3'- zum 5'Ende aufgebaut wird.

Die trägergebundene Triestermethode zur Synthese von Oligonucleotiden ist derzeit so konzipiert [16], daß an niedrig beladenen Trägern (ca. 5 µMol Monomerbaustein pro g Träger) die Synthese begonnen und in automatisierten Schritten weitergeführt wird. Das Ergebnis sind einige A_{260} - Einheiten eines Oligonucleotids, die zur Durchführung molekularbiologischer Experimente genügen. Die trägergebundene Triestermethode kann bisher nicht in beliebig großen Ansätzen durchgeführt werden. Mit ein Grund liegt darin, daß verschiedene Syntheseschritte (Detritylierung, Kondensation bspw.) kinetisch kontrolliert ablaufen und mit Nebenreaktionen (Depurinierung, Kettenbruch) konkurrieren. Bei Erhöhung der Ansätze ist die gewünschte Kinetik nicht gewährleistet. Um die von uns angestrebten Oligonucleotidmengen (>20 mg) zu erhalten wäre somit eine oftmalige Wiederholung kleiner Ansätze nötig. Dieses Verfahren würde jedoch die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Falschsequenzen erhöhen.

B. PROBLEMSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Synthese in Mengen von $>$ 20 mg und Charakterisierung der Oligodesoxyribonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$. Die Synthese wird nach der Triestermethode zunächst in Lösung, dann trägergebunden durchgeführt. Hierbei soll geklärt werden, ob längere Oligonucleotide in Mengen $>$ 20 mg trägergebunden praktikabel synthetisiert werden können. Auf der Basis der Syntheseergebnisse sollen Vor- und Nachteile der beiden Varianten der Triestermethode diskutiert werden. Außerdem wurden in unserem Labor verschiedene neue Träger auf Acrylbasis und Vinylsuccinatbasis entwickelt, die auf ihre Verwendbarkeit zur Oligonucleotidsynthese getestet werden sollen. Zu diesem Zweck soll zuerst das Problem der Art der Verankerung zwischen Polymermatrix und dem ersten Monomerbaustein der geplanten Sequenz gelöst werden. Danach soll der am höchsten mit Monomerbaustein beladbare Träger zur Synthese genommen werden.

C. ALLGEMEINER TEIL

1. Synthese der Oligodesoxyribonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ mit der Triestermethode in Lösung

Die Darstellung der geplanten Sequenzen beginnt mit der Synthese des Octanucleosidheptaphosphats $d(A_4C_4)$ und wird jeweils mit dem Aufbau des nächstlängeren Oligodesoxyribonucleotids fortgesetzt. Hierzu dient dann das Octamere in geschützter Form jeweils als wesentlicher Baustein. Die Beschreibung der zur Darstellung aller Sequenzen verwendeten Techniken (Kondensation, Decyanoethylierung, Detritylierung, Chromatographie an Kieselgel) erfolgt anhand der Synthese von $d(A_4C_4)$ und den hierzu benötigten Synthesebausteinen. Die Darstellung aller geplanten Oligodesoxyribonucleotide ist in den Schemata 4 - 9 zusammengestellt. Da auf Grund des repetitiven Charakters der obigen Oligonucleosidphosphate verschiedene Synthesebausteine mehrfach verwendet werden können (vgl. Schemata 4 - 9), erfolgt deren Darstellung in großen Ansätzen. Daraus folgt, daß sowohl das Octanucleosidheptaphosphat $d(A_4C_4)$ in geschützter Form als auch die zum Aufbau von $d(A_4C_4)$ benötigten geschützten Nucleotidblöcke in Grammengen dargestellt werden müssen. Im Fall der Nucleotidblöcke werden die in Tab. 1 zusammengestellten Ansätze z. T. mehrmals durchgeführt.

1.1. Darstellung des Octanucleosidheptaphosphats $d(A_4C_4)$

Das Octanucleosidheptaphosphat $d(A_4C_4)$ wird aus den monomeren 3'Phosphat- bzw. 5'OH-Komponenten $(MeO)_2TrOdbzA^{\ddagger-}Ba^{2+}_{0,5}$, $(MeO)_2TrOdanC^{\ddagger-}Ba^{2+}_{0,5}$ bzw. $dbzA^{\ddagger}CNET$, $danC^{\ddagger}CNET$ und dem 3'terminalen geschützten Nucleosid danC(Bz) dargestellt. Die 5'OH-Komponenten werden aus den entsprechenden 3'Phosphatkomponenten mit den in Tab. 3 zusammengefaßten Bedingungen synthetisiert (vgl. Schema 1 III⟶IV).

Tab. 1: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten bei der Synthese geschützter Oligodesoxyribonucleotide

Syntheseprodukt (Nr.) [Zahl der Ansätze]	5'-OH-Komponente	3'-Phosphat-komponente	Kondensationsmittel TPS	Tetrazol Methylimidazol[x)]	Zeit	Pyridin Acetonitril	Ausbeute	
	mMol (g)		mMol (g)		(min)	(ml)	%	(g)
$(MeO)_2$TrOdanC^{ib} danC(Bz) (I) [1]	danC(Bz) 5,2 (2,5)	$(MeO)_2$TrOdanC^{ib} 6,5 (6,0)	13,0 (3,9)	26,0[x)] (2,1)	33	20	76,0	(4,1)
$(MeO)_2$TrOdanC^{ib} danC^{ib}CNET (II) [2]	danC^{ib}CNET 3,2 (2,0)	$(MeO)_2$TrOdanC^{ib} 4,0 (3,7)	8,0 (2,5)	16,0[x)] (1,3)	33	20	71,5	(3,4)
MeOTrOdanC^{ib} danC^{ib}CNET (III) [1]	danC^{ib}CNET 2,4 (1,5)	MeOTrOdanC^{ib} 3,0 (2,8)	6,0 (1,8)	12,0[x)] (1,0)	30	20	77,0	(3,5)
$(MeO)_2$TrOdanC^{ib} $(danC^{ib})_2$danC(Bz) (IV) [2]	I* 1,6 (1,7)	II** 2,0 (2,8)	6,9 (2,0)	20,6 (1,5)	80	15	50,0	(2,5)

Fortsetzung Tab. 1

Syntheseprodukt (Nr.) [Zahl der Ansätze]	5'-OH-Komponente	3'-Phosphat-komponente	Kondensationsmittel TPS	Tetrazol Methylimidazol[x)]	Zeit	Pyridin Acetonitril	Ausbeute	
	mMol (g)		mMol (g)		(min)	(ml)	%	(g)
MeOTrOdanC^{ib} $(danC^{ib})_2$ danC^{ib}CNET (V) [1]	II* 1,7 (2,0)	III** 2,0 (2,7)	6,0 (1,8)	18,0 (1,3)	90	20	62,0	(2,6)
$(MeO)_2$TrOdanC^{ib} $(danC^{ib})_2$danC^{ib}CNET (VI) [2]	II* 1,1 (1,3)	II** 1,5 (2,1)	3,7 (1,1)	11,0 (0,8)	80	15	72,0	(2,0)
$(MeO)_2$TrOdbzA^{ib} dbzA^{ib}CNET (VII) [2]	dbzA^{ib}CNET 4,0 (2,5)	$(MeO)_2$TrdbzA^{ib} 5,0 (4,6)	10,0 (3,0)	20,0[x)] (1,6)	25	18	52,2	(3,5)
$(MeO)_2$TrOdbzA^{ib} $(dbzA^{ib})_2$dbzA^{ib}CNET (VIII) [7]	VII* 0,8 (1,0)	VII** 1,1 (1,5)	3,0 (0,9)	9,0 (0,6)	80	15	54,0	(1,2)
$(MeO)_2$TrOdbzA^{ib} $(dbzA^{ib})_3(danC^{ib})_3$ danC(Bz) (IX) [1]	IV* 1,1 (2,4)	VIII** 1,3 (3,4)	3,3 (1,1)	9,9 (0,7)	65	20	54,6	(2,8)

Fortsetzung Tab. 1

Syntheseprodukt (Nr.) [Zahl der Ansätze]	5'-OH-Komponente	3'-Phosphat-komponente	Kondensationsmittel TPS	Tetrazol Methylimidazol	Zeit	Pyridin Acetonitril	Ausbeute
	mMol (g)		mMol (g)		(min)	(ml)	% (g)
$(MeO)_2$TrOdanC^{ibu} $(danC^{ibu})_3(dbzA^{ibu})_4$ $(danC^{ibu})_3$danC(Bz) (X) [1]	IX* 0,3 (1,4)	VI** 0,4 (1,0)	1,2 (0,4)	3,6 (0,3)	70	15	63,0 (1,5)
MeOTrOdanC^{ibu} $(danC^{ibu})_3(dbzA^{ibu})_3$ dbzA^{ibu}CNET (XI) [1]	VIII* 0,4 (1,0)	V** 0,5 (1,2)	1,2 (0,4)	3,5 (0,3)	65	15	43,8 (0,8)
$(MeO)_2$TrOdbzA^{ibu} $(dbzA^{ibu})_3(danC^{ibu})_3$ danC^{ibu}CNET (XII) [1]	VI* 0,4 (0,9)	VIII** 0,5 (1,3)	1,3 (0,4)	4,0 (0,3)	70	15	45,0 (0.8)
$(MeO)_2$TrOdbzA^{ibu} $(dbzA^{ibu})_3(danC^{ibu})_4$ $(dbzA^{ibu})_4(danC^{ibu})_3$ danC(Bz) (XIII) [1]	IX* 0,14(0,61)	XII** 0,17(0,80)	0,7 (0,2)	2,2 (0,2)	75	12	43,0 (0,6)

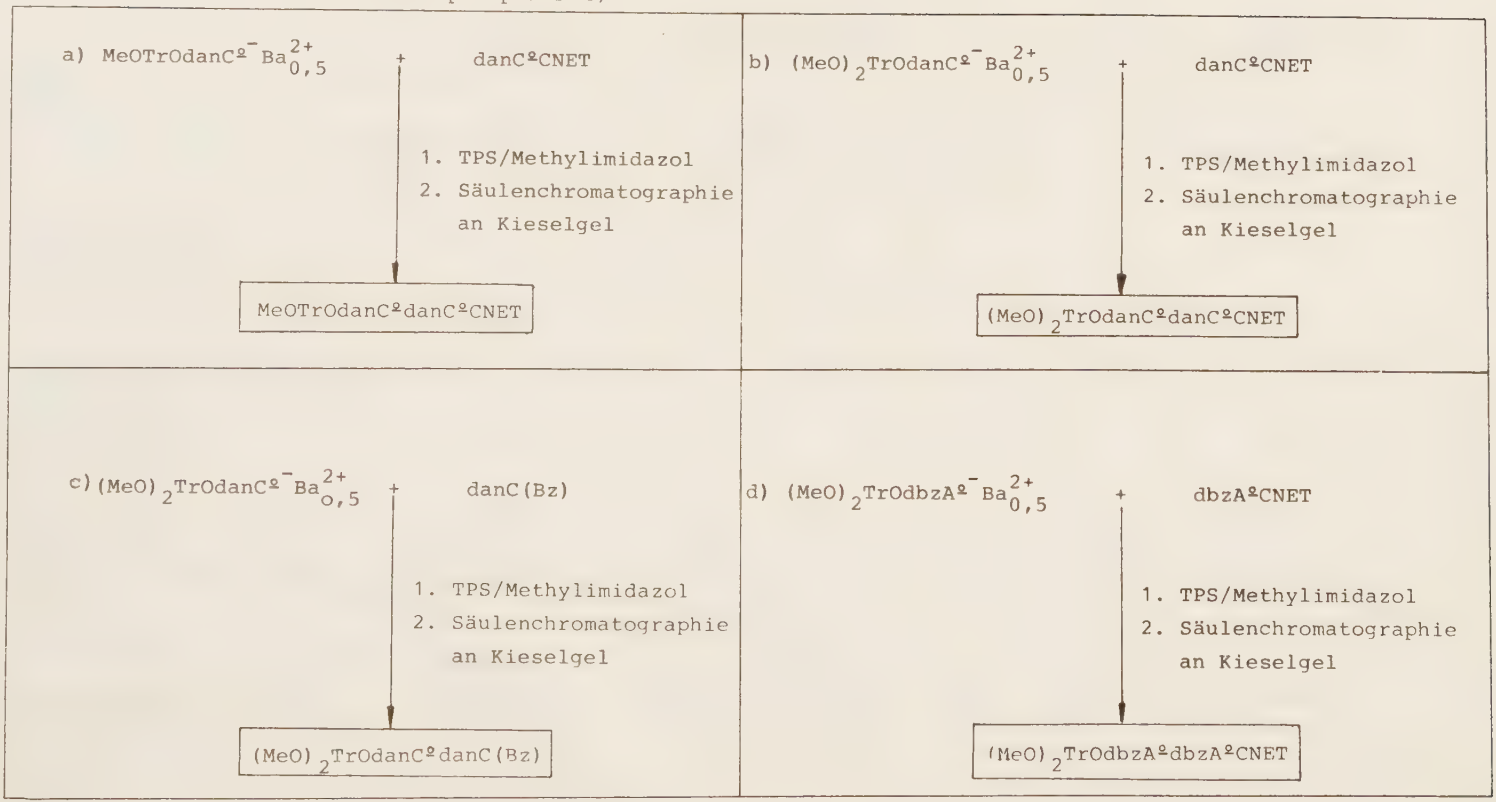
Fortsetzung Tab. 1

Syntheseprodukt (Nr.) [Zahl der Ansätze]	5'-OH-Komponente	3'Phosphat-komponente	Kondensationsmittel TPS	Tetrazol Methylimidazol	Zeit	Pyridin Acetonitril	Ausbeute	
	mMol (g)		mMol (g)		(min)	(ml)	%	(g)
MeOTrOdanC^{ibu} ($danC^{ibu}$)$_3$($dbzA^{ibu}$)$_4$ ($danC^{ibu}$)$_4$($dbzA^{ibu}$)$_4$ ($danC^{ibu}$)$_3$danC(Bz) (XIV) [1]	X* 0,16(1,04)	XI** 0,17(0,80)	0,8 (0,2)	2,5 (0,2)	75	15	59,2	(1,1)

* Nach Entfernen der Dimethoxytritylgruppe

** Nach Entfernen der Cyanoethylgruppe

Schema 4: Darstellung der geschützten Dinucleotide und des Dinucleosidmonophosphats c)



Schema 5: Darstellung des geschützten Tetranucleosidtriphosphats a) und der geschützten Tetranucleotide

a) $(MeO)_2TrOdanC^{\circ}danC^{\circ}CNET$

1. TEA
2. - $CH_2{=}CH{-}C{\equiv}N$

$(MeO)_2TrOdanC^{\circ}danC^{\circ-}$

$(MeO)_2TrOdanC^{\circ}danC(Bz)$

1. H^+
2. - $(MeO)_2TrOH$
3. Säulenchromatographie an Kieselgel

$danC^{\circ}danC(Bz)$

+

1. TPS/Tetrazol
2. Säulenchromatographie an Kieselgel

$(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_2danC(Bz)$

---

b) $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}dbzA^{\circ}CNET$

1. TEA
2. - $CH_2{=}CH{-}C{\equiv}N$

$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}dbzA^{\circ-}$

$(MeO)_2TrObzA^{\circ}dbzA^{\circ}CNET$

1. H^+
2. - $(MeO)_2TrOH$
3. Säulenchromatographie an Kieselgel

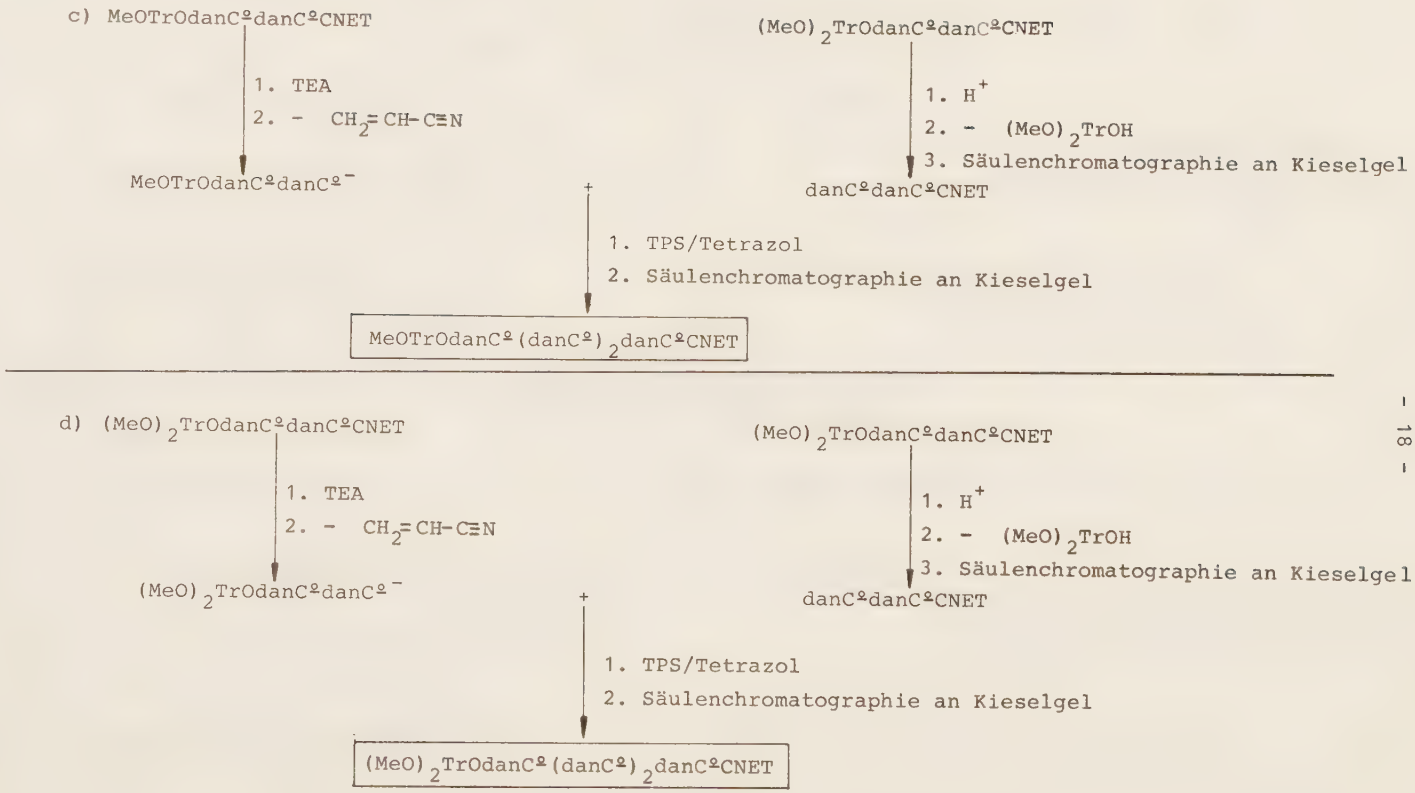
$dbzA^{\circ}dbzA^{\circ}CNET$

+

1. TPS/Tetrazol
2. Säulenchromatographie an Kieselgel

$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ}CNET$

Fortsetzung Schema 5:



Schema 6: Darstellung des geschützten Octanucleosidheptaphosphats (6a) und der Octanucleotide

a) $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ}CNET$

1. TEA
2. - $CH_2=CH-C\equiv N$

$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ-}$

$(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_2danC(Bz)$

1. H^+
2. - $(MeO)_2TrOH$
3. Säulenchromatographie an Kieselgel

$(danC^{\circ})_3danC(Bz)$

+

1. TPS/Tetrazol
2. Säulenchromatographie an Kieselgel

$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC(Bz)$

b) $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ}CNET$

1. TEA
2. - $CH_2=CH-C\equiv N$

$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ-}$

$(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_2danC^{\circ}CNET$

1. H^+
2. - $(MeO)_2TrOH$
3. Säulenchromatographie an Kieselgel

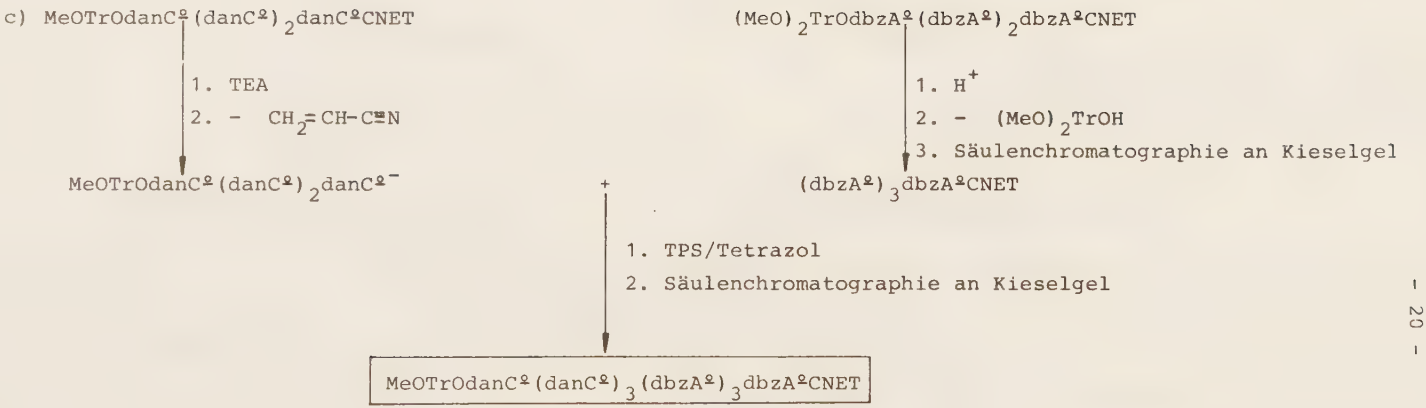
$(danC^{\circ})_3danC^{\circ}CNET$

+

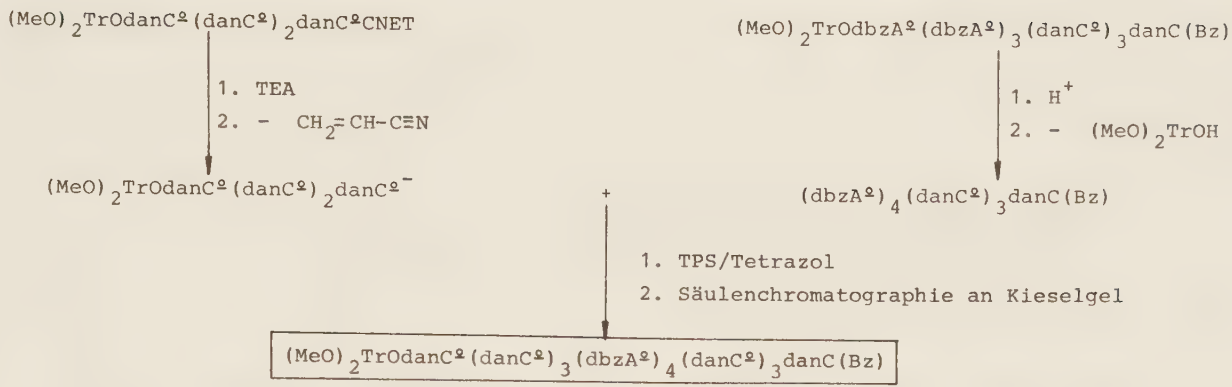
1. TPS/Tetrazol
2. Säulenchromatographie an Kieselgel

$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC^{\circ}CNET$

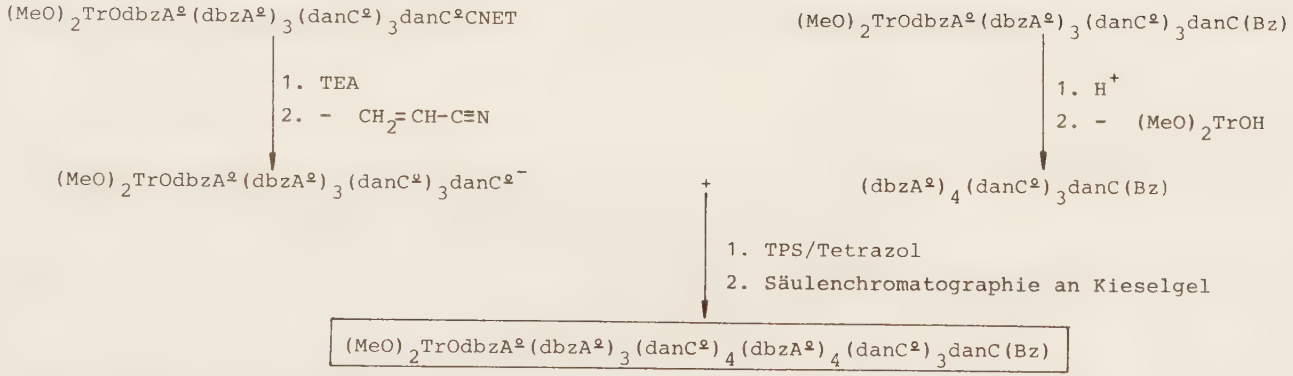
Fortsetzung Schema 6:



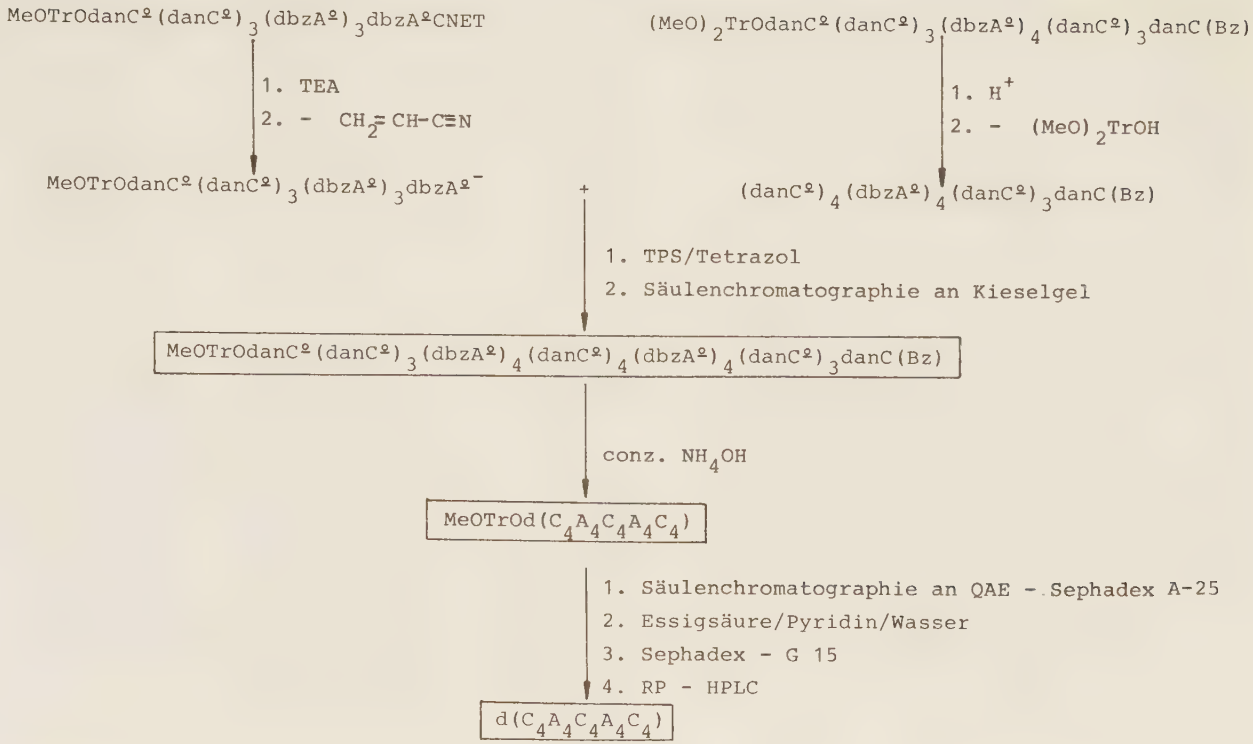
Schema 7: Darstellung des geschützten Dodecanucleosidundecaphosphats



Schema 8: Darstellung des Hexadecanucleosidpentadecaphosphats



Schema 9: Darstellung des Eikosanucleosidnonadecaphosphats.



Die 3'Phosphatkomponente wird dazu in wasserfreiem Pyridin unter Ausschluß von Feuchtigkeit durch Zugabe eines Überschusses an Cyanoethanol und einer Mischung aus TPS und Tetrazol als Kondensationsmittel, die im Überschuß bezüglich Cyanoethanol eingesetzt wird, in den geschützten Triester $(MeO)_2$TrOdN²CNET überführt. Das Reaktionsende wird nach ca. 1 Stunde mit DC festgestellt. Anschließend wird $(MeO)_2$TrOdN²CNET mit Benzolsulfonsäure [2 %ige Lösung in $CHCl_3$: MeOH 6: 4 (v/v)] detrityliert. Die entstandene monomere 5'OH-Komponente wird an Kieselgel mit den in Tab. 3 zusammengefaßten Bedingungen gereinigt. Die Identifizierung der Produktfraktionen erfolgt dünnschichtchromatographisch. Einheitliche Produktfraktionen werden gepoolt, eingeengt und aus Petrolether/Ether 4:1 (v/v) gefällt. Zur Darstellung von danC(Bz) aus $(MeO)_2$TrOdanC vgl. D. 2.5.

Der Aufbau der Sequenz mit den beschriebenen Monomeren erfolgt blockweise in sechs Kondensationsschritten und zwar gleichzeitig vom 5'Ende (Blöcke mit Adenin als Basenresten) und vom 3'Ende her (Blöcke mit Cytosin als Basenresten).

Der Ablauf der Synthese wird zunächst kurz skizziert.

Kondensationsschritte 1 - 3:

Zuerst werden die zur Darstellung des geplanten Octadesoxyribonucleotids benötigten Dimeren $(MeO)_2$TrOdanC²danC²CNET, $(MeO)_2$TrOdanC²danC(Bz) und $(MeO)_2$TrOdbzA²dbzA²CNET aus den entsprechenden monomeren 3'Phosphat- und 5'OH-Komponenten auf die in Schema 4 b) - d) dargestellte Weise synthetisiert.

Kondensationsschritte 4 - 5:

Die obigen dimeren Nucleotidblöcke werden nach Abspalten entweder der Cyanoethylgruppe oder der Dimethoxytritylgruppe in 3'- oder 5'Richtung (vgl. Schema 5 a) - b)) zu den tetrameren Oligonucleosidphosphaten $(MeO)_2$TrOdbzA²

$(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ}CNET$ und $(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_2danC(Bz)$ verlängert, die wiederum analog Schema 6 a) im

Kondensationsschritt 6

zum Endprodukt $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC(Bz)$ umgesetzt werden.

In dem so gewählten Syntheseplan sehen wir zwei Vorteile. Der dimere Nucleotidblock $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}dbzA^{\circ}CNET$ kann zweimal verwendet werden und zwar einmal nach Decyanoethylierung als dimere 3'Phosphatkomponente und einmal nach Detritylierung als dimere 5'OH-Komponente jeweils zur Darstellung von $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ}CNET$ (vgl. Schema 5 b)). Weiterhin resultiert bei jedem Syntheseschritt ein Produkt mit doppelter Kettenlänge bezüglich eingesetzter 5'OH-Komponente. Zur Abtrennung der bei der Kondensation evtl. nicht voll umgesetzten 5'OH-Komponente vom Kondensationsprodukt an Kieselgel sind damit auf Grund des unterschiedlichen R_F-Wertes beider Komponenten die besten Voraussetzungen vorhanden.

Die Kondensationen werden nach den in Tab. 1 angegebenen Bedingungen zur Synthese Dimerer in Acetonitril [17], zur Darstellung aller anderen geschützten Oligonucleosidphosphate in Pyridin jeweils unter Feuchtigkeitsausschluß bei RT durchgeführt. In allen Kondensationen werden die monomeren und oligomeren 3'Phosphatkomponenten im Überschuß bezüglich der monomeren bzw. oligomeren 5'OH-Komponenten eingesetzt (vgl. Tab. 1). Als Kondensationsmittel dient eine Mischung aus TPS und Methylimidazol oder Tetrazol. TPS wird im Überschuß bezüglich der eingesetzten 3'Phosphatkomponente, Methylimidazol bzw. Tetrazol im Überschuß bezüglich TPS eingesetzt. Methylimidazol wird nur bei Anwendung von Acetonitril als Reaktionsmedium verwendet. Mit diesen Mischungen sind nach unseren Erfahrungen im Vergleich mit anderen Kondensationsmitteln die besten Umsätze zu erzielen. Die aufgrund der kurzen Kondensationszeit (25 - 30 min) vorteilhafte Anwendung von Acetonitril als Reaktionsmedium muß nach unseren Erfahrungen auf die Synthese dimerer Blöcke beschränkt bleiben. Schon bei der Synthese tetramerer Blöcke in Acetonitril ist ein drastischer Rückgang des Umsatzes festzustellen. Der Verlauf der Kondensationen wird mit DC verfolgt. Wenn die 5'OH-Komponente nach der mit dem jeweiligen Kondensationsmittel gängigen Reaktionszeit (vgl. Tab. 1) aus dem Kondensationsansatz verschwunden ist, wird die Reaktion abgebrochen. Die erhaltenen Konden-

sationsgemische werden mit den in Tab. 2 zusammengefaßten Bedingungen an Kieselgel chromatographiert. Die Elution von der Säule geht folgendermaßen vonstatten: Zunächst wird die Säule je nach Menge der umgesetzten Komponenten mit ca. 2 - 4 l Chloroform gewaschen, bis die Absorption des Eluats auf ca. 0,20 A_{260}-Einheiten gesunken ist. Daraufhin erfolgt Elution von evtl. noch auf der Säule adsorbierten Verunreinigungen und schließlich des Produkts mit Chloroform/Ethanol - Gemischen definierter Zusammensetzung. Man beginnt mit ca. 1 l des Gemisches mit dem geringsten Ethanolanteil. Mit jedem weiteren 1 Elutionsmittel wird der prozentuale Ethanolanteil am Volumen des Eluenten erhöht. Diese Art der Elution des Produkts mit Hilfe von Stufengradienten führt auf Grund von Ergebnissen der in unserem Labor durchgeführten Versuche zu besseren Resultaten, als die Elution mit Chloroform/Ethanol- oder Chloroform/Methanol-Gemischen im linearen Gradienten, wie sie schon beschrieben wurde [17]. Von der Säule eluierte Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Produktfraktionen sind dabei folgendermaßen zu identifizieren: Sie enthalten den nach der Kondensation am stärksten tritylpositiven Fleck (tritylpositive Banden werden durch Besprühen des DC mit einem Gemisch aus Ethanol/Perchlorsäure 9:1 [v/v] sichtbar gemacht) des Kondensationsgemisches. Die im Überschuß eingesetzten 3'Phosphatkomponenten bleiben auf der Säule adsorbiert. Einheitliche Produktfraktionen von Dinucleosidmonophosphaten, Dinucleotiden, Tetranucleosidtriphosphaten und Tetranucleotiden werden gepoolt, eingeengt und das Produkt mit Petrolether/Ether 4:1 (v/v) ausgefällt. Die erzielten Ausbeuten liegen bei der Darstellung der Dinucleosidmonophosphate und Dinucleotide von Cytidin zwischen 70 und 80 %, bei den anderen dimeren und tetrameren Nucleotidblöcken zwischen 50 und 60 %.

Nach erfolgter Chromatographie des Kondensationsgemisches an Kieselgel werden Aliquots der geschützten Oligodesoxyribonucleotidblöcke von den Schutzgruppen befreit und papierchromatographisch (Laufmittelsystem A für Dimere, Laufmittelsystem B für längere Nucleotidblöcke) untersucht. Dabei ist zu beachten, daß o-Chlorphenylschutzgruppen 3'endständiger Phosphate nicht abspaltbar sind und diese Blöcke daher nur auf papierchromatographische Einheitlichkeit überprüfbar sind. 3'benzoylierte

Tab. 2: Bedingungen der Chromatographie von Kondensationsgemischen an Kieselgelsäulen

Zu isolierendes Produkt (Nr.)	(g) *	Säulenfüllung (cm)	Stufengradient (l)	eluierte Prod. (Nr.)
$(MeO)_2$TrOdanC$^{\varrho}$danC(Bz)		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,5)	?
(I)	(5,4)		2. 95:5 (1,5)	(I)
$(MeO)_2$TrOdanC$^{\varrho}$danC$^{\varrho}$CNET		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0)	?
(II)	(4,8)		2. 95:5 (1,5)	(II)
MeOTrOdanC$^{\varrho}$danC$^{\varrho}$CNET		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0)	?
(III)	(4,5)		2. 95:5 (1,2)	(III)
$(MeO)_2$TrOdanC$^{\varrho}$ ($danC^{\varrho}$)$_2$danC(Bz)		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0)	?
(IV)	(5,0)		2. 98:2 (1,0)	
			3. 95:5 (2,0)	(IV)
MeOTrOdanC$^{\varrho}$($danC^{\varrho}$)$_2$ danC$^{\varrho}$CNET		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0)	?
(V)	(4,2)		2. 95:5 (2,0)	(V)
$(MeO)_2$TrOdanC$^{\varrho}$($danC^{\varrho}$)$_2$ danC$^{\varrho}$CNET		18 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0)	?
(VI)	(2,8)		2. 96:4 (1,0)	(VI)
$(MeO)_2$TrOdbzA$^{\varrho}$dbzA$^{\varrho}$CNET		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(4,0)	?
(VII)	(6,7)		2. 95:5 (1,5)	(VII)
$(MeO)_2$TrOdbzA$^{\varrho}$($dbzA^{\varrho}$)$_2$ dbzA$^{\varrho}$CNET		18 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0)	?
(VIII)	(2,2)		2. 95:5 (1,0)	(VIII)
			3. 92:8 (1,0)	
$(MeO)_2$TrOdbzA$^{\varrho}$($dbzA^{\varrho}$)$_3$ ($danC^{\varrho}$)$_3$danC(Bz)		25 x 5,5	1. $CHCl_3$(1,0)	?
(IX)	(5,2)		2. 98:2 (1,0)	?
			3. 95:5 (1,0)	?
			4. 93:7 (1,0)	(IX)

Fortsetzung Tab. 2

Zu isolierendes Produkt (Nr.)	(g) *	Säulenfüllung (cm)	Stufengradient (l)	eluierte Prod. (Nr.)
$(MeO)_2TrOdanC^{\ddagger}(danC^{\ddagger})_3$ $(dbzA^{\ddagger})_4(danC^{\ddagger})_3danC(Bz)$ (X)	(2,4)	12 x 5,5	1. $CHCl_3$(1,0) 2. 98:2 (1,0) 3. 95:5 (1,2) 4. 93:7 (1,5)	? 5'OH-Komponente (X)
$MeOTrOdanC^{\ddagger}(danC^{\ddagger})_3$ $(dbzA^{\ddagger})_3dbzA^{\ddagger}CNET$ (XI)	(1,8)	12 x 5,5	1. $CHCl_3$(2,0) 2. 98:2 (1,0) 3. 95:5 (1,7) 4. 93:7 (1,0)	? (XI)
$(MeO)_2TrOdbzA^{\ddagger}(dbzA^{\ddagger})_3$ $(danC^{\ddagger})_3danC^{\ddagger}CNET$ (XII)	(1,8)	10 x 5,5	1. $CHCl_3$(1,5) 2. 98:2 (1,0) 3. 95:5 (1,0) 4. 93:7 (1,0)	? ? (XII)
$(MeO)_2TrOdbzA^{\ddagger}(dbzA^{\ddagger})_3$ $(danC^{\ddagger})_4(dbzA^{\ddagger})_4(danC^{\ddagger})_3$ danC(Bz) (XIII)	(1,4)	10 x 5,5	1. $CHCl_3$(1,0) 2. 98:2 (1,0) 3. 95:5 (1,0) 4. 92:8 (1,0) 5. 88:12(1,0)	? 5'OH-Komponente (XIII)
$MeOTrOdanC^{\ddagger}(danC^{\ddagger})_3$ $(dbzA^{\ddagger})_4(danC^{\ddagger})_4(dbzA^{\ddagger})_4$ $(danC^{\ddagger})_3danC(Bz)$ (XIV)	(1,9)	10 x 5,5	1. $CHCl_3$(0,5) 2. 93:7 (1,0) 3. 90:10(1,5)	? (XIV) verunr.

* Die Angabe in g entspricht einer Ausbeute von 100 %

Tab. 3: Bedingungen und Ergebnisse 1. der Cyanoethylierung, 2. der Detritylierung und 3. der chromatographischen Reinigung von 5'OH-Komponenten

Ausgangsverbindung		1. Cyanoethylierung						2. Detritylierung		Reaktionsprodukt	3. Chromatographische Reinigung der Reaktionsprodukte			
Bezeichnung		TPS		Tetrazol		Cyanoethanol		Bedingungen			Säulenfüllung	Stufengradient	eluierte Produkte	Ausbeute
mMol	(g)	mMol	(g)	mMol	(g)	mMol	(g)	(min)	(° C)		(cm)	(l)	Bezeichnung	(g) (%)
$(MeO)_2TrOdanC^{ø-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$										danC^{ø}CNET		1. $CHCl_3$ 2,0	$(MeO)_2TrOH$	
												2. 95:5 1,0	?	
13,0	(12,0)	32,5	(9,9)	97,5	(6,8)	77,8	(5,6)	3,0	22		25 x 5,5		5'OH-Komponente	4,3 53,7
$(MeO)_2TrOdbzA^{ø-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$										dbzA^{ø}CNET		1. $CHCl_3$ 2,0	$(MeO)_2TrOH$	
												2. 96:4 1,0	?	
11,0	(10,0)	27,3	(8,3)	82,0	(5,7)	65,2	(4,8)	2,0	0 - 5		25 x 5,5		5'OH-Komponente	2,4 36,0
$(MeO)_2TrOdanC^{ø}$ danC^{ø}CNET										danC^{ø} danC^{ø}CNET		1. $CHCl_3$ 3,0	$(MeO)_2TrOH$	
												2. 95:5 2,0	?	
3,0	(4,4)	-	-	-	-	-	-	2,0	22		18 x 5,5		5'OH-Komponente	2,5 71,8
$(MeO)_2TrOdbzA^{ø}$ dbzA^{ø}CNET										dbzA^{ø} dbzA^{ø}CNET		1. $CHCl_3$ 4,0	$(MeO)_2TrOH$	
												2. 95:5 1,5	?	
3,6	(5,2)		-	-	-	-	-	3,0	0		18 x 5,5		5'OH-Komponente	1,7 41,4
$(MeO)_2TrOdanC^{ø}$ $(danC^{ø})_2danC(Bz)$										$(danC^{ø})_3$ danC(Bz)		1. $CHCl_3$ 2,0	$(MeO)_2TrOH$	
												2. 95:5 1,0	?	
1,1	(2,8)	-	-	-	-	-	-	2,0	22		10 x 5,5		5'OH-Komponente	2,2 85,8

Fortsetzung Tab. 3:

Ausgangsverbindung 1. Cyanoethylierung *								2. Detritylierung **		Reaktionsprodukt	3. Chromatographische Reinigung der Reaktionsprodukte				
Bezeichnung		TPS		Tetrazol		Cyanoethanol		Bedingungen			Säulenfüllung	Stufengradient	eluierte Produkte		Ausbeute
mMol	(g)	mMol	(g)	mMol	(g)	mMol	(g)	(min)	(° C)		(cm)	(l)	Bezeichnung	(g)	(%)
$(MeO)_2TrOdbzA^{ib}$ $(dbzA^{ib})_2dbzA^{ib}CNET$										$(dbzA^{ib})_3$ $dbzA^{ib}CNET$		1. $CHCl_3$ 2,5	$(MeO)_2TrOH$		
												2. 95:5 1,0	?		
1,2	(3,2)	-	-	-	-	-	-	1,5	0 - 5		18 x 5,5	3. 93:7 1,5	5'OH-Komponente	2,1	75,0
$(MeO)_2TrOdanC^{ib}$ danC(Bz)										danC^{ib} danC(Bz)		1. $CHCl_3$ 2,5	$(MeO)_2TrOH$		
												2. 95:5 1,5	?		
4,0	(5,3)	-	-	-	-	-	-	2,0	22		18 x 5,5		5'OH-Komponente	3,2	79,0

* Cyanoethylierungen werden in ca. 50 ml Pyridin durchgeführt.

** Detritylierungen werden in ca. 160 ml Benzolsulfonsäure [2 %ige Lösung in Chloroform/Methanol 6:4 (v/v)] durchgeführt.

Produkte sind dagegen mit den in unserem Labor synthetisierten Referenznucleotiden $d(C)_2$ und $d(C)_4$ eindeutig identifizierbar. Papierchromatographisch nicht einheitliche Zwischenprodukte werden nochmals an Kieselgel gereinigt. Anschließend werden bei den einzelnen dimeren und tetrameren Nucleotidblöcken entsprechend ihrer weiteren Verwendung (vgl. Schemata 4 b) - d) und 5 a) - b)) entweder die Cyanoethylschutzgruppe in Pyridin/Triethylamin 1:1 (v/v) oder die Dimethoxytritylschutzgruppe mit den Bedingungen aus Tab. 3 in Benzolsulfonsäure [2 %ige Lösung in Chloroform/Methanol 6:4 (v/v)] abgespalten. Beim $(MeO)_2$TrOdbzA^{Ac}dbzA^{Ac}CNET werden 60 % der Produktmenge detritylliert, die anderen 40 % decyanoethyliert. Detritylierte und damit oligomere 5'OH-Komponenten werden bis zur Kettenlänge 4 erneut mit den in Tab. 3 zusammengefaßten Bedingungen an Kieselgel chromatographiert. Oligomere 3'Phosphatkomponenten werden dagegen nach Entfernung des Triethylamins direkt zur Kettenverlängerung eingesetzt.

Nach erfolgter Kondensation und Reinigung des Kondensationsgemisches von $(MeO)_2$TrOdbzA^{Ac}(dbzA^{Ac})$_3$(danC^{Ac})$_3$danC(Bz) an Kieselgel werden die eluierten Fraktionen zusätzlich untersucht. Es hat sich nämlich in unseren Versuchen gezeigt, daß etwa ab Kettenlänge 8 des Kondensationsproduktes tritylpositive Verunreinigungen und 5'OH-Komponente während der Chromatographie von Kondensationsgemischen auf Grund ihrer wenig unterschiedlichen R_F-Werte z. T. schwierig unterscheidbar sind. Daher werden die mit Stufengradienten von der Säule eluierten Fraktionen von $(MeO)_2$TrOdbzA^{Ac}(dbzA^{Ac})$_3$(danC^{Ac})$_3$danC(Bz) zusätzlich zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung spektralphotometrisch vermessen. Die bei 280 nm erhaltenen Werte werden graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Das hiermit erhaltene Elutionsprofil ist in Fig. 1 a) abgebildet, es läßt einen eindeutigen Produktpeak erkennen. Der Stufengradient ist gestrichelt eingezeichnet. Darüberhinaus ist das Absorptionsverhältnis 280/300 nm jeder gemessenen Fraktion, die damit einen Punkt im Elutionsprofil darstellt, eingetragen. Das Absorptionsverhältnis 280/300 nm soll neben dem Meßwert bei 280 nm als weiteres Kriterium beim Bestimmen der Produktfraktionen dienen. Fraktionen, deren Absorptionsverhältnis 280/300 nm mehr als 0,15 vom entsprechenden Verhältnis

des Wertes mit der stärksten Absorption bei 280 nm abweicht werden deshalb nicht als Produktfraktionen betrachtet. Es handelt sich hierbei ausschließlich um Fraktionen im Randbereich des Produktpeaks (vgl. Fig. 1 a)). Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden gepoolt, eingeengt und das Produkt mit Petrolether/Ether 4:1 (v/v) ausgefällt. Vom geschützten Octanucleosidheptaphosphat können 2,8 g synthetisiert werden. Die Ausbeute der letzten Kondensation beträgt 54,6 % d. Th..

Die Hauptmenge des Produkts wird detrityliert. Aufgrund unserer Erfahrung hat sich gezeigt, daß bei der Chromatographie von Octameren und längeren 5'OH-Komponenten an Kieselgel keinerlei Verunreinigungen außer der Tritylgruppe abgetrennt werden können. Die abgespaltene Schutzgruppe wird daher durch Ausfällen des Produkts aus Petrolether/Ether 4:1 (v/v) entfernt.

1.2. Darstellung des Dodecanucleosidundecaphosphats $d(C_4A_4C_4)$

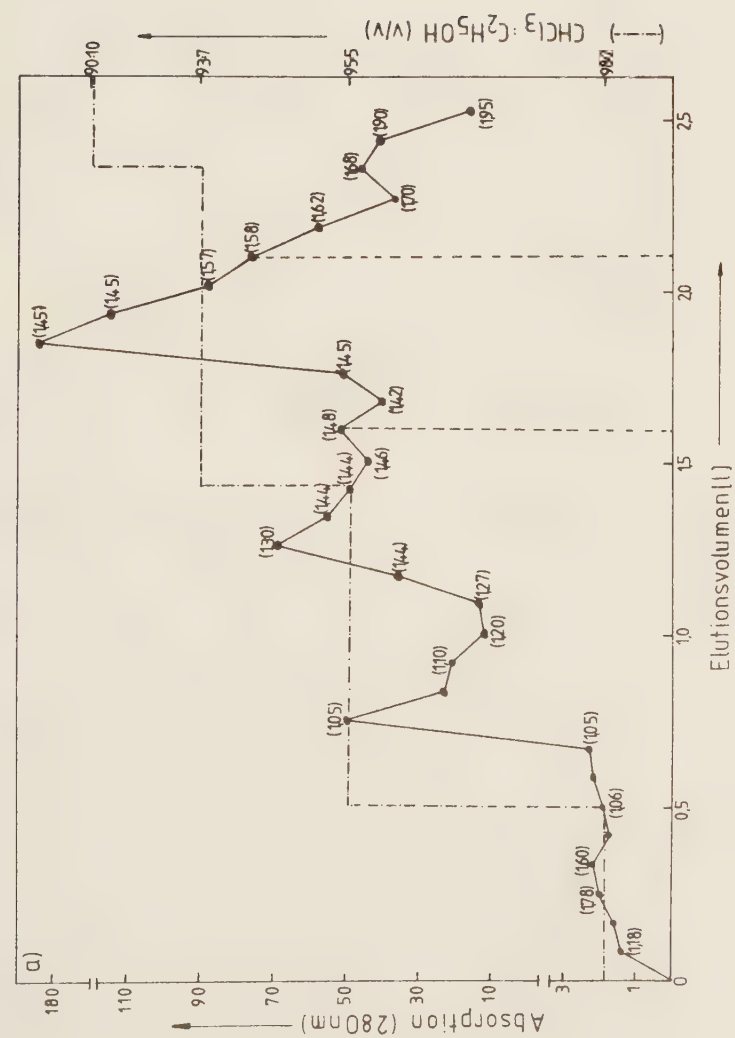
Die Synthese des Dodecanucleosid undecaphosphats erfolgt aus $(dbzA^{Ac})_4(danC^{Ac})_3danC(Bz)$ und dem bei der vorangegangenen Synthese dargestellten geschützten Dinucleotid $(MeO)_2$ TrOdanC^{Ac}danC^{Ac}CNET (vgl. Schema 4 b)) anhand Schema 7 in zwei Schritten. Kondensationsbedingungen sind in Tab. 1, die Reinigung der Kondensationsgemische in Tab. 2 zusammengefaßt. Die Bedingungen zur Chromatographie von dimeren 5'OH-Komponenten nach erfolgter Detritylierung sind in Tab. 3 zu finden.

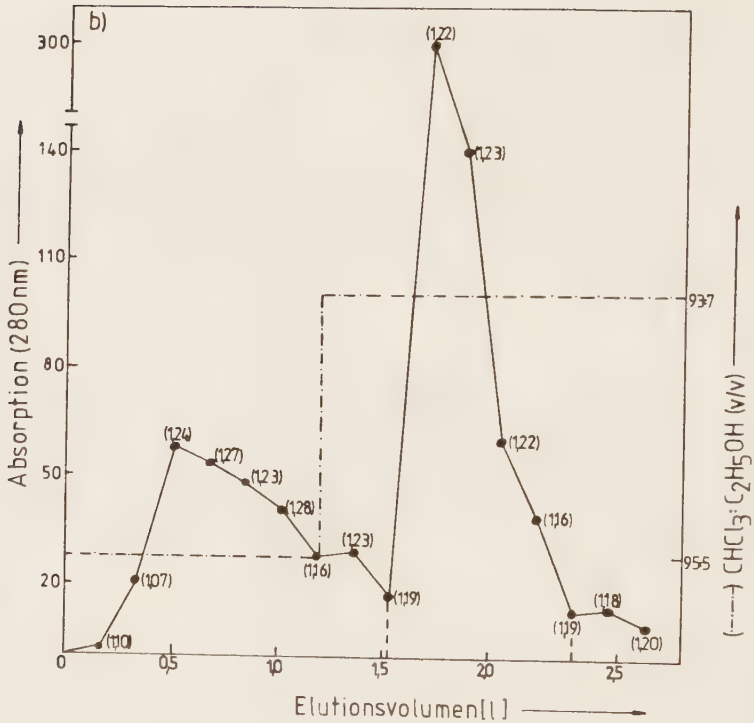
Kondensationsschritt 1:

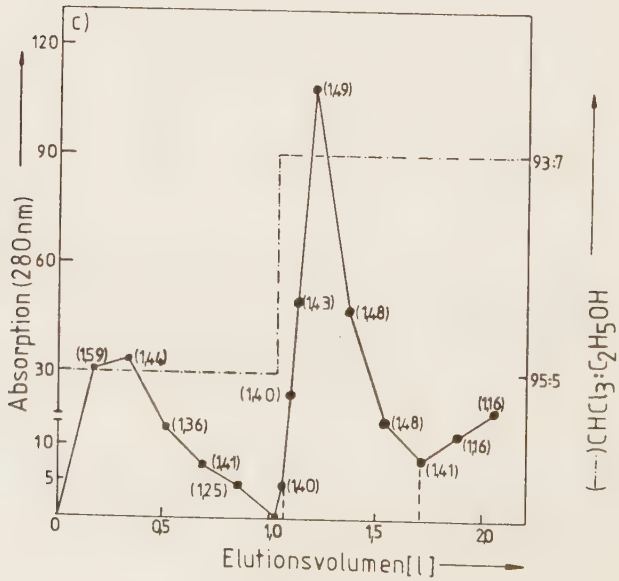
Das Dinucleotid $(MeO)_2$TrOdanC^{Ac}danC^{Ac}CNET dient zwei Zwecken. Analog Schema 5 b) wird ein Teil decyanoethyliert (40 %) ein anderer Teil detrityliert (60 %). Nach erfolgter Kondensation der erhaltenen Komponenten wird das gereinigte Tetranucleotid $(MeO)_2$TrOdanC$^{Ac}(danC^{Ac})_2$danC^{Ac}CNET nach Decyanoethylierung als 3'Phosphatkomponente im

Kondensationsschritt 2:

mit $(dbzA^{Ac})_4(danC^{Ac})_3danC(Bz)$ zum Dodecanucleosidundecaphosphat $(MeO)_2$TrOdanC$^{Ac}(danC^{Ac})_3(dbzA^{Ac})_4(danC^{Ac})_3danC(Bz)$ kondensiert.


a)
Absorption (280nm)
180
110
90
70
50
30
10
3
1
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Elutionsvolumen(l)
(---) CHCl3:C2H5OH (v/v)
90:10
93:7
95:5
98:2
(118)
(178)
(160)
(105)
(106)
(105)
(110)
(120)
(127)
(144)
(130)
(144)
(144)
(146)
(148)
(142)
(145)
(145)
(157)
(158)
(162)
(168)
(190)
(170)
(195)


b)
Absorption (280nm)
300
140
110
80
50
20
0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Elutionsvolumen[l]
(1,22)
(1,23)
(1,24)
(1,27)
(1,23)
(1,28)
(1,23)
(1,16)
(1,07)
(1,10)
(1,19)
(1,22)
(1,16)
(1,18)
(1,19)
(1,20)
93:7
95:5
(---) CHCl3:C2H5OH (v/v)


c)
Absorption (280nm)
120
90
60
30
10
5
0
0,5
1,0
1,5
2,0
Elutionsvolumen[l]
(1,49)
(1,43)
(1,48)
(1,59)
(1,44)
(1,40)
(1,36)
(1,48)
(1,16)
(1,41)
(1,16)
(1,25)
(1,40)
(1,41)
93:7
95:5
(---) CHCl3:C2H5OH

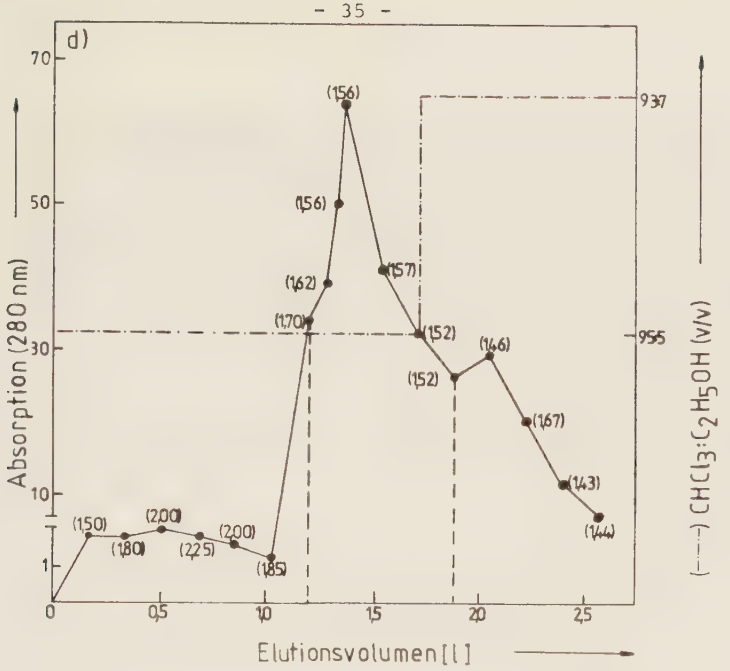


Fig. 1:

Elutionsprofile der säulenchromatographischen Reinigung der Kondensationsgemische der Oligonucleosidphosphate
a) $(MeO)_2$TrOdbzA^{ac}$(dbzA^{ac})_3$$(danC^{ac})_3$danC(Bz);
b) $(MeO)_2$TrOdanC^{ac}$(danC^{ac})_3$$(dbzA^{ac})_4$$(danC^{ac})_3$danC(Bz);
c) $(MeO)_2$TrOdbzA^{ac}$(dbzA^{ac})_3$$(danC^{ac})_3$danC^{ac}CNET;
d) MeOTrOdanC^{ac}$(danC^{ac})_3$$(dbzA^{ac})_3$dbzA^{ac}CNET
an Kieselgel. Säulenfüllung (vgl. Tab. 2), Durchfluß 800 ml/h. Die Elution erfolgt nach dem Waschen der Säule mit 2 - 4 l Chloroform mit dem gestrichelt eingezeichneten Stufengradienten der Zusammensetzung Chloroform/Ethanol 98:2 (v/v) bis maximal 90:10 (v/v). Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung werden so vereinigt, daß die Fraktionen im Randbereich der Hauptpeaks in ihren 280/300 nm Werten weniger als 0,15 vom 280/300 nm Wert der Gipfelfraktionen abweichen. Die auf ca. 30 ml eingeengten Peakfraktionen werden aus Petrolether/Ether 4:1 (v/v) gefällt. Die Ausbeuten sind in Tab. 1, die Ergebnisse der Trennungen in Tab. 2. zusammengefaßt.

Das bei der Reinigung des Endprodukts an Kieselgel erhaltene Elutionsprofil (vgl. Fig. 1 b)) zeigt einen eindeutigen Produktpeak. Aufgrund der bei der Synthese des Octanucleosidheptaphosphats gewonnenen Erfahrung kann die spektralphotometrische Vermessung der Fraktionen, die als Produktfraktionen vermutet werden, eingeschränkt werden. Nach Ausfällen des Produkts erhält man 1,5 g (Ausbeute 63 %) an $(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_3(dbzA^{\circ})_4(danC^{\circ})_3danC(Bz)$. Bei der papierchromatographischen Überprüfung (Laufmittelsystem B) eines entschützten Aliquots des Dodecameren werden ca. 20 % Verunreinigung an $d(A_4C_4)$ gefunden. Dies würde die im Vergleich zur Darstellung des Octanucleosidheptaphosphats höhere Ausbeute erklären. Die festgestellte Verunreinigung kann nicht abgetrennt werden.

1.3. Darstellung des Hexadecanucleosidpentadecaphosphats $d(A_4C_4A_4C_4)$

Das Hexadecanucleosidpentadecaphosphat wird aus dem Octanucleosidheptaphosphat $(dbzA^{\circ})_4(danC^{\circ})_3danC(Bz)$ (vgl. 1.1.) und den Tetranucleotiden $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_2dbzA^{\circ}CNET$ und $(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_2danC^{\circ}CNET$ (vgl. Schema 5 b) bzw. 5 d)) in zwei Kondensationsschritten aufgebaut. Die beiden tetrameren Komponenten wurden bereits mit den in 1.1. bzw. 1.2. durchgeführten Synthesen dargestellt. Im

Kondensationsschritt 1

erfolgt der Aufbau des Octanucleotids $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC^{\circ}CNET$ anhand von Schema 6 b). Das Elutionsprofil der Chromatographie des Kondensationsgemisches an Kieselgel ist in Fig. 1 c) abgebildet.

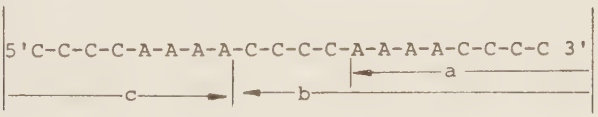
Kondensationsschritt 2:

Durch Umsetzung von $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC^{\circ-}$ und $(dbzA^{\circ})_4(danC^{\circ})_3danC(Bz)$ (vgl. Schema 8) wird das Hexadecanucleosidpentadecaphosphat $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_4(dbzA^{\circ})_4(danC^{\circ})_3danC(Bz)$ dargestellt. Aufgrund der gewählten Synthesestrategie resultiert ein maximaler Unterschied in der Kettenlänge zwischen eingesetzter 5'OH-Komponente und synthetisiertem Produkt. Der somit unterschiedliche R_F-Wert beider Komponenten

wird zur vollständigen Abtrennung des nicht umgesetzten Teils der 5'OH-Komponente der Kondensation an Kieselgel genutzt. Die Chromatographie des Kondensationsgemisches wird angesichts der anstehenden Reinigung des Syntheseprodukts nach dem Entfernen der Schutzgruppen mit geringerem Aufwand betrieben. Die spektralphotometrische Vermessung der Produktfraktionen unterbleibt deshalb. Die Ausbeute nach Isolieren des Syntheseprodukts beträgt 600 mg ≙ 43 % d. Th..

1.4. Synthese des Eikosanucleosidnonadecaphosphats $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

Die Darstellung des Eikosadesoxyribonucleotids erfolgt aus dem Dodecanucleosidundecaphosphat $(danC^{ø})_4(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC(Bz)$, dem Tetranucleotid $(MeO)_2TrOdbzA^{ø}(dbzA^{ø})_2dbzA^{ø}CNET$ (vgl. Schema 5 d)), dem Dinucleotid $(MeO)_2TrOdanC^{ø}danC^{ø}$ CNET (vgl. Schema 4 b)), der monomeren Phosphatkomponente MeOTrO $danC^{ø-}Ba^{2+}_{0,5}$ und der monomeren 5'OH-Komponente $danC^{ø}CNET$ in vier Kondensationsschritten.



Schema 10: Syntheseplan zum Aufbau des Eikosanucleosidnonadecaphosphats. Auf die Darstellung der Schutzgruppen wird verzichtet.
Pfeil a: $d(A_4C_4)$
Pfeil b: $d(C_4A_4C_4)$
Pfeil c: $d(C_4A_4p)$

Aus dem Syntheseplan (vgl. Schema 10) wird die Art des Aufbaus der Sequenz deutlich. Vom 3'Ende der Sequenz ausgehend wird zunächst $d(A_4C_4)$ (Pfeil a) in geschützter Form dargestellt (vgl. Schema 6 a)), anschließend zum Dodecanucleosidundecaphosphat verlängert (vgl. Pfeil b; vgl. Schema 7). Vom 5'Ende der

Sequenz her wird das Octanucleotid MeOTrOdanC^{Ac}(danC^{Ac})$_3$(dbzA^{Ac})$_3$ dbzA^{Ac}CNET synthetisiert (Pfeil c, vgl. Schema 6 c)).

Die beschriebene Synthesestrategie hat nach unserer Meinung zwei Vorteile. Zum einen kann die Synthese von beiden Enden ausgehend gleichzeitig erfolgen, zum anderen sind vom längeren Teilstück der Sequenz (Pfeil b) alle Schutzgruppen abspaltbar und somit das Dodecamere eindeutig auf Reinheit überprüfbar. Im

Kondensationsschritt 1

wird das Dinucleotid MeOTrOdanC^{Ac}danC^{Ac}CNET durch Kondensation aus MeOTrOdanC^{Ac-} $Ba^{2+}_{0,5}$ und danC^{Ac}CNET dargestellt (vgl. Schema 4 a)). Das mit

Kondensationsschritt 2

anhand von Schema 5 c) erhaltene Tetranucleotid MeOTrOdanC^{Ac}(danC^{Ac})$_2$danC^{Ac}CNET wird analog Schema 6 c) im

Kondensationsschritt 3

mit (dbzA^{Ac})$_3$dbzA^{Ac}CNET zum Octanucleotid MeOTrOdanC^{Ac}(danC^{Ac})$_3$(dbzA^{Ac})$_3$ dbzA^{Ac}CNET kondensiert. Das Elutionsprofil der Chromatographie an Kieselgel ist in Fig. 1 d) abgebildet. Von diesem Octanucleotid werden 800 mg (43,8 % Ausbeute) isoliert.

Kondensationsschritt 4

Der letzte Syntheseschritt zum Eikosanucleosidnonadecaphosphat (vgl. Schemata 9 und 10) wird durch Kondensation des Dodecanucleosidundecaphosphats (danC^{Ac})$_4$(dbzA^{Ac})$_4$(danC^{Ac})$_3$ danC(Bz) und des Octanucleotids MeOTrOdanC^{Ac}(danC^{Ac})$_3$(dbzA^{Ac})$_3$dbzA^{Ac-} in zwei gleich großen Ansätzen vollzogen (vgl. Schema 9). Die mit 1,1 g (59 %, aus zwei Ansätzen gemittelt) für ein Syntheseprodukt dieser Kettenlänge überaus hohe Ausbeute wird folgendermaßen erklärt: Die mit den Kondensationsgemischen des Eikosanucleosidnonadecaphosphats durchgeführten Reinigungen an Kieselgel führen zu keinerlei Abtrennung von Verunreinigungen. Dies überrascht nicht, treten doch wie beschrieben schon bei kürzeren Kettenlängen Schwierigkeiten dieser Art auf.

1.5. Abspalten der Schutzgruppen

Zuerst werden die Basen- und Phosphatschutzgruppen sowie die Benzoylschutzgruppe durch fünftägige Behandlung der dargestellten Oligonucleosidphosphate mit conz. NH_3 abgespalten. Entgegen der allgemein üblichen Methode erfolgt die Abspaltung der Phosphatschutzgruppe (o-Chlorphenyl-) nicht separat mit dem von Reese [10] vorgeschlagenen Oximat-Ion, sondern zusammen mit den Basenschutzgruppen und der 3'endständigen Benzoylschutzgruppe. Die in dem von Reese beschriebenen Reagenz (vgl. D. 9.4.) enthaltenen und teilweise schlecht entfernbaren Komponenten komplizieren nach unserer Erfahrung die Reinigung der Syntheseprodukte. Weiterhin hat sich die o-Chlorphenylschutzgruppe als hervorragend mit conz. NH_3 abspaltbar erwiesen, wobei nicht mehr Nebenprodukte festgestellt werden können [17]. Zuletzt werden die Tritylschutzgruppen mit Eisessig/Pyridin/Wasser 14:1:3 (v/v/v) abgespalten. Das von der Neutralisation des Gemisches nach beendeter Spaltung herrührende Salz wird anschließend an Sephadex G-15 entfernt.

Das Eikosanucleosidphosphat wird nicht detrityliert, sondern in der Form $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$ lyophilisiert.

1.6. Isolierung der synthetisierten Oligonucleosidphosphate

Aliquots der dargestellten Oligodesoxyribonucleotide $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$ werden zunächst papierchromatographisch (Laufmittelsystem B) untersucht. Die Chromatographiedauer beträgt zwei bis drei Tage beim Octanucleosid- und Dodecanucleosidphosphat. Das Hexadecanucleosidphosphat und das Eikosanucleosidphosphat werden dagegen 3 - 4 Tage chromatographiert, wobei sich $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$ ca. 10 cm vom Ursprung des Papierchromatogramms entfernt. Im Fall des Eikosanucleosidphosphats werden nicht tritylpositive UV-Flecken als Verunreinigung betrachtet. Es hat sich gezeigt, daß die Mono- oder Dimethoxytritylschutzgruppe den R_F-Wert eines Oligonucleosidphosphats auf dem Papier soweit erhöht, daß er demjenigen eines um vier Monomereinheiten kürzeren Oligomeren entspricht. Das Hexadecanucleosidpentadecaphosphat hat daher in der Papierchromatographie denselben

R_F-Wert wie MeOTrOd($C_4A_4C_4A_4C_4$).

Es ergab sich, daß d(A_4C_4), d($C_4A_4C_4$) und d($A_4C_4A_4C_4$) relativ einheitlich bezüglich Kettenlänge sind und daher ohne weitere Vorreinigung mit HPLC an reverser Phase gereinigt werden können. Die Chromatographie von MeOTrOd($C_4A_4C_4A_4C_4$) ergibt, daß es sich hierbei um ein Gemisch des Eikosanucleosidphosphats und kürzeren Oligonucleotiden handelt. Daher wird beim Eikosanucleosidphosphat eine Vorreinigung in tritylierter Form durchgeführt. Die Tritylgruppe soll dabei eine bessere Identifizierung der Produktfraktionen ermöglichen.

Die Vorreinigung des tritylierten Eikosanucleosidnonadecaphosphats wird angesichts der Substanzmenge nicht an Partisil 10-SAX sondern an QAE-Sephadex A-25 durchgeführt. Sie erfolgt exakt mit den schon durch Reinigung von Aliquots der Zwischenprodukte d($C_4A_4C_4$) und d(A_4C_4) an QAE-Sephadex A-25 getesteten Bedingungen (vgl. D. 8. und Fig. 18 a), b)). Das bei der Vorreinigung des Eikosameren an QAE-Sephadex A-25 erhaltene Elutionsprofil (vgl. Fig. 18 c)) zeigt, daß ca. 40 % der als "Produkt" von der Kieselgelsäule eluierten Substanz aus d($C_4A_4C_4$), der zur Kondensation eingesetzten 5'OH-Komponente besteht. Da der Reaktionsumsatz nach Kieselgelsäule 59 % betrug, läßt sich damit schließen, daß der effektive Umsatz bei der Darstellung des Eikosameren nur zwischen 20 und 30 % liegt.

1.6.1. Säulenchromatographische Reinigung mit RP - HPLC

Mit je einem Aliquot (bis ca. 1 A_{260} - Einheit) von d(A_4C_4), d($C_4A_4C_4$), d($A_4C_4A_4C_4$) und d($C_4A_4C_4A_4C_4$) wird zunächst ein analytischer Säulenlauf mit HPLC an reverser Phase durchgeführt. Die Elution der Säule erfolgt jeweils im steigenden Gradienten mit einem Eluenten der anfänglichen Zusammensetzung B 20 % (entspricht 20 % Volumenanteil an MeOH: 0,05 M NH_4Ac 80:20 (v/v) und 80 % Volumenanteil an 0,05 M NH_4Ac). Die Elution ist mit Erreichen der Eluentenzusammensetzung B 40 % oder im Fall des Eikosanucleosidnonadecaphosphats mit B 70 % beendet. Die Bedingungen und Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Die Ausarbeitung der Bedingungen zur Reinigung der Syntheseprodukte mit RP - HPLC erfolgte durch Doz. Dr. H. Eckstein in unserem Labor. Die Elutionsprofile (vgl. Fig. 2 a) - d))

Tab. 4: Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung synthetischer Oligonucleosidphosphate mit Hilfe der HPLC an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}). Analytische Trennungen erfolgen an einer 250 x 4,6 mm Säule, die präparativen an einer 280 x 8 mm* Säule. Die Elution wird mit einem Gemisch aus 0,05 M NH_4Ac (Eluent A) und Methanol/0,05 M NH_4Ac 8:2 (v/v) durchgeführt.

Oligonucleotid Bezeichnung	analytische Trennungen			Fig.	präparative Trennungen			Fig.
	Gradient (% B)	Gradientendauer (min)	Retentionszeit (min)	Nr.	Gradient (% B)	Gradientendauer (min)	Retentionszeit (min)	Nr.
$d(A_4C_4)$	20 - 40	3 - 15	12,20	2 a)	25	15	4,95	3 a)
$d(C_4A_4C_4)$	20 - 40	3 - 15	12,31	2 b)	20 - 70	3 - 33	8,53	3 b)
$d(A_4C_4A_4C_4)$	20 - 40	3 - 15	13,89	2 c)	25	20	15,94	3 c)
$d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	20 - 70	3 - 33	12,96	2 d)	23	20	9,15	3 d)

* Vorsäule 30 x 8 mm, Säule 250 x 8 mm.

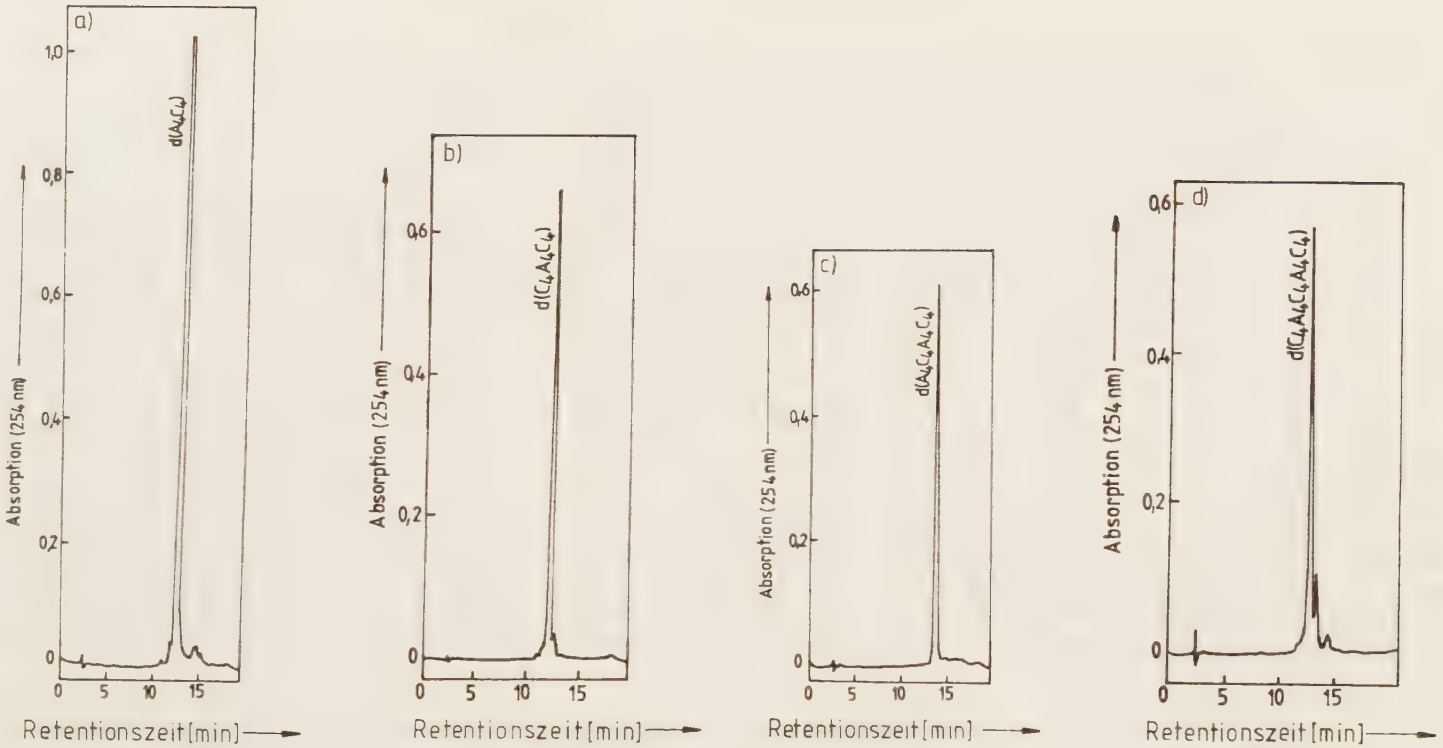


Fig. 2: Elutionsprofile der analytischen säulenchromatographischen Trennung der Oligonucleosidphosphate a) $d(A_4C_4)$; b) $d(C_4A_4C_4)$; c) $d(A_4C_4A_4C_4)$; d) $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$. Die Trennung erfolgt an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) mit Hilfe der HPLC im steigenden Gradienten (vgl. Tab. 4).

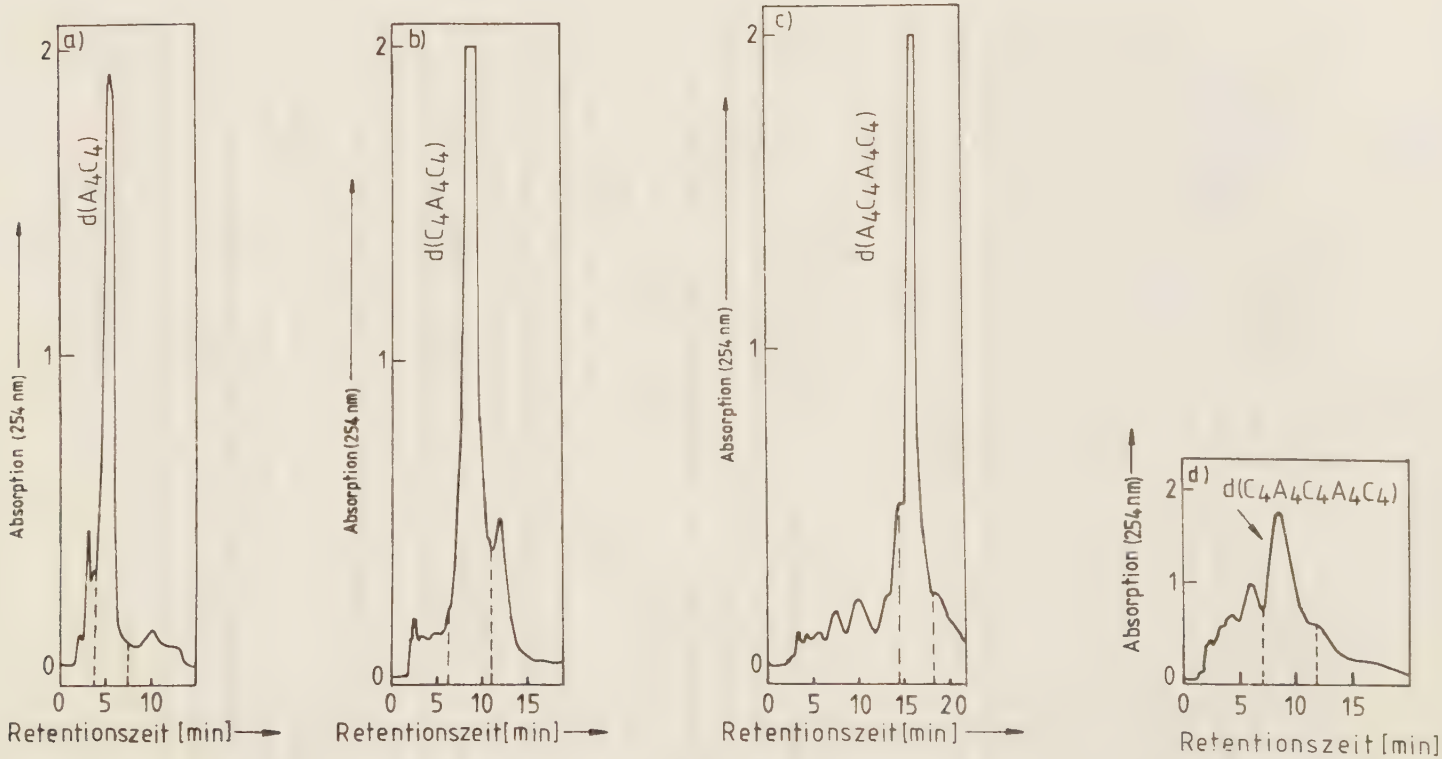


Fig. 3: Elutionsprofile der präparativen säulenchromatographischen Trennung der Oligonucleosidphosphate a) $d(A_4C_4)$; b) $d(C_4A_4C_4)$; c) $d(A_4C_4A_4C_4)$; d) $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$. Die Trennung erfolgt an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) mit Hilfe der HPLC teils isokratisch, teils im steigenden Gradienten (vgl. Tab. 4). Zur vollständigen Identifizierung der in den Produktpeaks enthaltenen Oligonucleosidphosphate a) - d) vgl. Fig. 4 - 7.

zeigen, daß keine wesentlichen Verunreinigungen mehr abgetrennt werden können. Die Produktpeaks erscheinen einheitlich. Bemerkenswert ist, daß das Hexadecanucleosidpentadecaphosphat damit bereits nach Chromatographie an Kieselgel als nicht weiter verunreinigt zu bezeichnen ist. Dies ist für ein Syntheseprodukt dieser Kettenlänge ein nicht von vornherein zu erwartendes Ergebnis.

Die Bedingungen und Ergebnisse der anschließend durchgeführten Aufarbeitung der Hauptmenge der dargestellten Oligonucleosidphosphate mit Hilfe einer für präparative Zwecke dimensionierten HPLC Säule an reverser Phase sind in Tab. 4. zusammengefaßt. Die durch Aufarbeitung von bis zu 60 A_{260}-Einheiten pro Säulenlauf erhaltenen Elutionsprofile sind in Fig. 3 abgebildet. Die jeweils innerhalb der senkrechten Strichelung liegenden gepoolten Fraktionen werden nach Einengen lyophilisiert.

Die Elution erfolgt beim $d(A_4C_4)$ (25 % B), $d(C_4A_4C_4)$ (23 % B) und $d(A_4C_4A_4C_4)$ (25 % B) isokratisch. Das Eikosanucleosidphosphat $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ wird im Gradienten (20 - 70 % B) eluiert. Vom Eikosanucleosidphosphat können ca. 200 mg, vom Hexadecanucleosidphosphat ca. 250 mg isoliert werden. Das Octanucleosidheptaphosphat $d(A_4C_4)$ und das Dodecanucleosidundecaphosphat $d(C_4A_4C_4)$ werden im 250 - 270 mg Maßstab isoliert.

Die gut vergleichbaren Ergebnisse der analytischen HPLC an reverser Phase zeigen, daß die Retentionszeit zwar mit der Kettenlänge zunimmt, diese Zunahme aber stark von der Art der zusätzlich eingebauten Monomereinheiten abhängt. Der Einbau einer $d(C_4)$ - Einheit vom $d(A_4C_4)$ zum $d(C_4A_4C_4)$ resultiert nur in einer wenig unterschiedlichen innerhalb der Fehlergrenze liegenden Zunahme der Retentionszeit von 0,2 min. Die Retentionszeit des $d(A_4C_4A_4C_4)$ ist hingegen um 1,7 min länger als die des Octameren $d(A_4C_4)$. Somit wird deutlich, daß eine Verlängerung der Oligodesoxyribonucleotidkette mit $d(A_4)$ die Retentionszeit an Nucleosil 7 C_{18} nachhaltiger beeinflußt als mit $d(C_4)$.

1.7. Identifizierung mit der Fingerprinttechnik

Reinheit und Sequenz der Syntheseprodukte werden mit der Homochromatographie und zweidimensionalen Fingerprinttechnik wie von Jay [18], Schrade [19] und Watzlawick [20] beschrieben mit den Bedingungen aus Tab. 17 überprüft, wobei in Abwandlung zur Literatur ein nach eigenen Bedingungen dargestellter Homomix zur Auftrennung des Partialhydrolysats des Hexadeca- und Eikosanucleosidphosphats verwendet wird (vgl. D. 11.2.).

Ein Aliquot jedes Syntheseprodukts (0,01 A_{260}-Einheiten) wird an der 5'terminalen Hydroxylgruppe mit Hilfe von [γ-^{32}P] ATP und T_4 - Polynucleotidkinase enzymatisch phosphoryliert. Die radioaktiv markierten Oligonucleosidphosphate [^{32}P] d(A_4C_4), [^{32}P] d($C_4A_4C_4$), [^{32}P] d($A_4C_4A_4C_4$) und [^{32}P] d($C_4A_4C_4A_4C_4$) wandern in der Homochromatographie im wesentlichen als einheitliche Banden (vgl. Fig. 4 a) - d)). Im Autoradiogramm des Eikosanucleosidphosphats (vgl. Fig. 4 d)) ist außerdem der Reinigungseffekt der RP-HPLC erkennbar. In Bahn 1, das Produkt ist an RP - HPLC gereinigt, sind deutlich weniger Nebenprodukte zu erkennen als in Bahn 2. Die in den Autoradiogrammen zu erkennenden schwächeren Banden deuten auf Abbauaktivität des verwendeten Enzyms hin.

Die Kettenlänge der Syntheseprodukte wird durch Partialhydrolyse mit Phosphodiesterase aus Schlangengift und anschließender Homochromatographie des Partialhydrolysats überprüft. Die Auftrennung des Partialhydrolysats des Eikosanucleosidphosphats gelingt nicht. Die Kettenlänge kann somit mit Hilfe der Homochromatographie nicht überprüft werden. In. Fig. 5 a) - c) sind die Autoradiogramme der Partialhydrolysate von [^{32}P] d(A_4C_4), [^{32}P] d($C_4A_4C_4$) und [^{32}P] d($A_4C_4A_4C_4$) abgebildet. Beim Dodecanucleosidphosphat und Hexadecanucleosidphosphat sind jeweils die zu erwartenden 12 bzw. 16 Abbauprodukte zu sehen, die beim schrittweisen enzymatischen Abbau vom 3'Ende der entsprechenden Syntheseprodukte entstehen. Beim Octanucleosidphosphat sind nur 7 Abbauprodukte in Fig. 5 a) zu erkennen. Dies ist damit zu erklären, daß der oberste Fleck im Autoradiogramm aus technischen Gründen nicht zu sehen ist.

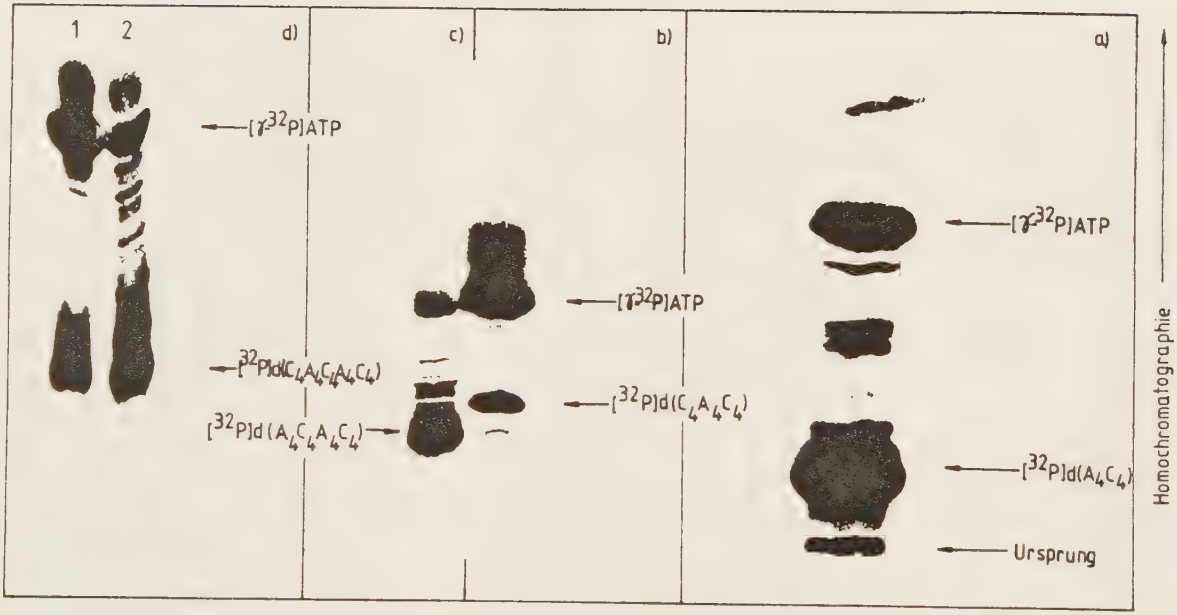


Fig. 4: Autoradiogramme der synthetischen Oligonucleosidphosphate, die mit Hilfe von [γ-^{32}P]ATP und T_4-Polynucleotidkinase an den 5'Hydroxylgruppen markiert und in der Homochromatographie aufgetrennt werden. a) [^{32}P]d(A_4C_4); b) [^{32}P]d($C_4A_4C_4$); c) [^{32}P]d($A_4C_4A_4C_4$); d) [^{32}P]d($C_4A_4C_4A_4C_4$). In Bahn 2 der Fig. 4 d) wird im Gegensatz zu Bahn 1 ein nicht mit RP - HPLC gereinigtes Aliquot von d($C_4A_4C_4A_4C_4$) markiert.

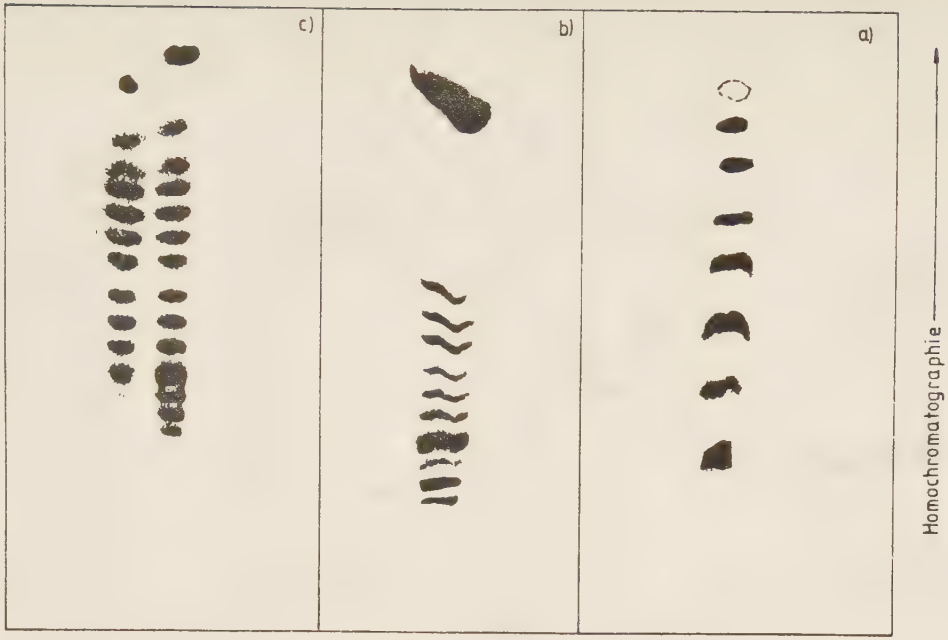


Fig. 5: Autoradiogramme der Partialhydrolysate der markierten synthetischen Oligonucleosidphosphate die mit Phosphodiesterase aus Schlangengift dargestellt und anschließend in der Homochromatographie aufgetrennt werden. a) $[^{32}P]d(A_4C_4)$; b) $[^{32}P]d(C_4A_4C_4)$; c) $[^{32}P]d(A_4C_4A_4C_4)$. Beim $[^{32}P]d(C_4A_4C_4)$ und $[^{32}P]d(A_4C_4A_4C_4)$ treten jeweils die zu erwartenden 12 bzw. 16 Abbauprodukte auf. Im Autoradiogramm von $[^{32}P]d(A_4C_4)$ sind nur 7 Abbauprodukte zu erkennen. Der oberste Fleck ist aus technischen Gründen nicht abgebildet. Die Bedingungen zur Darstellung der Partialhydrolysate, sowie die jeweils in der Homochromatographie verwendeten Laufmittel sind Tab. 17 zu entnehmen.

Fig. 6 a_1) - d_1):

Autoradiogramme nach der zweidimensionalen Auftrennung der Partialhydrolysate markierter synthetischer Oligonucleosidphosphate a_1) [^{32}P]d(A_4C_4); b_1) [^{32}P]d($C_4A_4C_4$); c_1) [^{32}P]d($A_4C_4A_4C_4$) und d_1) [^{32}P]d($C_4A_4C_4A_4C_4$). Die Partialhydrolysate werden in der 1. Dimension durch Elektrophorese bei pH 3,5 mit den Bedingungen aus Tab. 17, in der 2. Dimension homochromatographisch aufgetrennt.

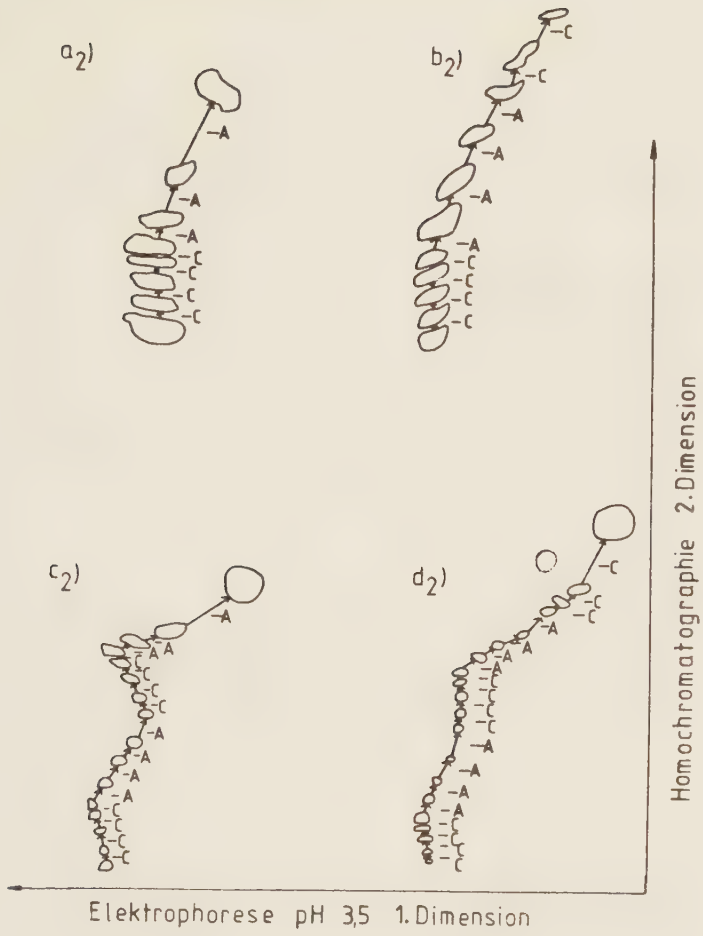
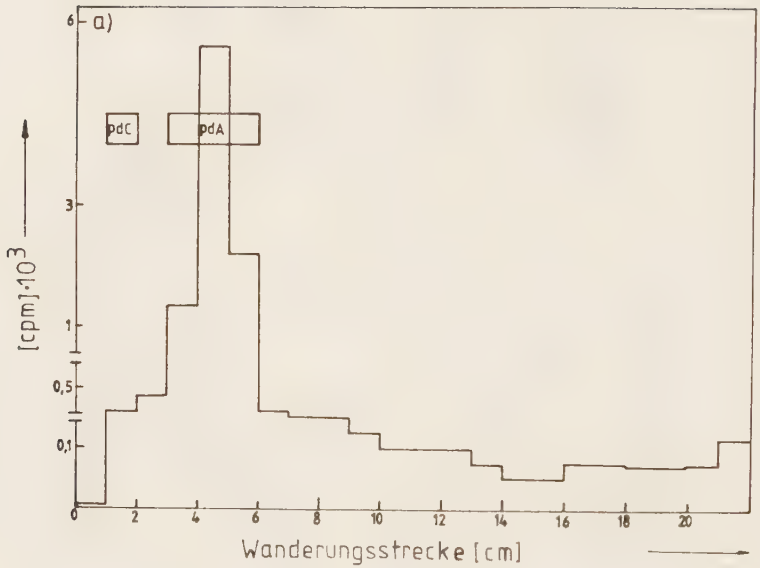
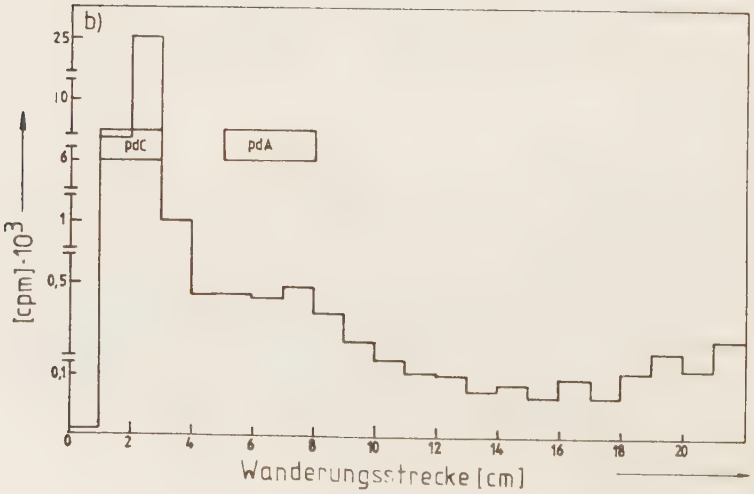


Fig. 6 a_2) - d_2):

Interpretation der Autoradiogramme aus Fig. 6 a_1) - d_1). Nach dem Gang der auftretenden Hauptflecken ergibt sich die Sequenz der Syntheseprodukte zu: a_2) $d(N\text{-}A_3C_4)$; b_2) $d(N\text{-}N_x\text{-}C_2A_4C_4)$; c_2) $d(N\text{-}A_3C_4A_4C_4)$; d_2) $N\text{-}C_3A_4C_4A_4C_4)$. In Fig. 6 b_1)/b_2) wird der 5'terminale Baustein im Fingerprint nicht erfaßt. N_x kann somit nicht bestimmt werden. Die 5'terminalen Bausteine $[^{32}P]dN$ werden papierelektrophoretisch bestimmt (vgl. Fig. 7).


a)
pdC
pdA
[cpm]·10³
6
3
1
0,5
0,1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Wanderungsstrecke [cm]


b)
pdC
pdA
[cpm]·10³
25
10
6
1
0,5
0,1
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Wanderungsstrecke [cm]

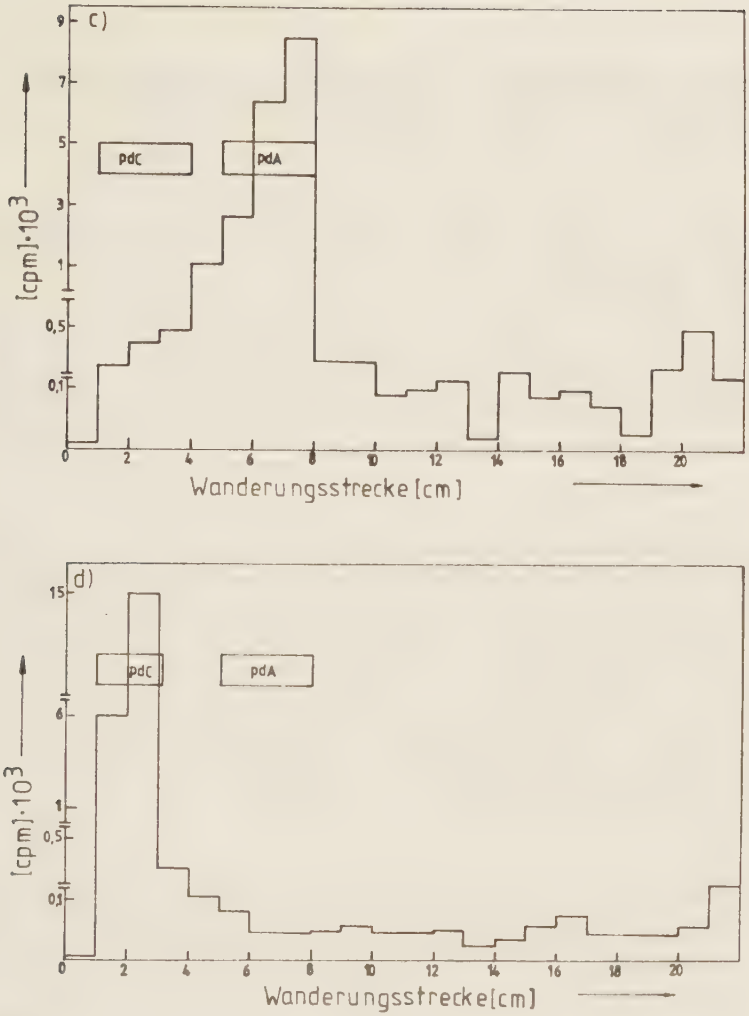


Fig. 7:

Aktivitätsprofile der Endgruppenbestimmungen synthetischer Oligonucleosidphosphate a) $d(A_4C_4)$; b) $d(C_4A_4C_4)$; c) $d(A_4C_4A_4C_4)$; d) $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$. Eine Mischung von pdA und pdC sowie die von der DEAE - Platte eluierte Aktivität des obersten Flecks im Fingerprint werden 2 h bei 4000 V papierelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vergleich der Wanderungsstrecken in cm der Nucleotide und der Aktivität erkennt man (vgl. Fig. 7) a) $[^{32}P]dA$; b) $[^{32}P]dC$; c) $[^{32}P]dA$ und $[^{32}P]dC$ als 5'terminale Bausteine. Beim Dodecanucleosidphosphat b) wird statt des obersten Flecks im Fingerprint das mittels Schlangengiftphosphodiesterase erhaltene Totalhydrolysat zur Papierelektrophorese verwendet.

Durch zweidimensionale Auftrennung der Partialhydrolysate wird die Sequenz der Syntheseprodukte ermittelt (vgl. Fig. 6 a_1) - 6 d_1)). Aus dem Gang der in den Autoradiogrammen (vgl. Fig. 6 a_2) - 6 d_2)) auftretenden Hauptflecken ergibt sich die Sequenz vom 5'Ende zu d(N - A_3C_4) (Fig. 6 a_2), d(N - N_x - $C_2A_4C_4$) (Fig. 6 b_2)), d(N - $A_3C_4A_4C_4$) (Fig. 6 c_2) und d(N - $C_3A_4C_4A_4C_4$) (Fig. 6 d_2)).

Der 5'terminale Baustein wird jeweils papierelektrophoretisch bestimmt, in dem ein Gemisch der Nucleotide pdA, pdC und die vom obersten Fleck des Autoradiogramms eluierte Aktivität papierelektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Vergleich der Wanderungsstrecken der Nucleotide und der Aktivität in cm kann der 5'terminale Baustein der Sequenz bestimmt werden. Im Falle des Dodecanucleosidphosphats d($C_4A_4C_4$) kann der 5'terminale Baustein nur durch Totalhydrolyse von [^{32}P] d($C_4A_4C_4$) bestimmt werden, da im Fingerprint (vgl. Fig. 6 b_1)) der oberste Fleck über den Rand der Dünnschicht wanderte. Nach Bestimmung des 5'terminalen Bausteins der Oligodesoxyribonucleotide (vgl. Fig. 7 a) - d)) lauten die Sequenzen: d(A_4C_4), d(C - N_x - $C_2A_4C_4$) d($A_4C_4A_4C_4$) und d($C_4A_4C_4A_4C_4$). Auf Grund des Aufbaus des Dodecanucleosidphosphats dürfte der nicht bestimmbare Baustein als pdC angenommen werden.

Nach erfolgter Synthese präparativer Mengen des Eikosanucleosidnonadecaphosphats d($C_4A_4C_4A_4C_4$) mit der Triestermethode in Lösung soll nun die trägergebundene Darstellung dieses Oligonucleosidphosphats in präparativen Mengen $>$20 mg versucht werden.

2. Trägergebundene Synthese der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

2.1. Einführung

Ein wesentlicher Vorteil der trägergebundenen Synthese von Oligonucleotiden gegenüber der Synthese in Lösung besteht darin, daß die aufwendige säulenchromatographische Reinigung der Kondensationsgemische nach den Kondensationsschritten entfällt, da die nicht immobilisierten Komponenten aus dem Träger gewaschen werden können. Der Zeitaufwand zur Darstellung von Oligonucleotiden wird dadurch drastisch reduziert. Ein weiterer Vorteil ist die Automatisierbarkeit [21] der Reaktionsschritte.

Die Vorteile der trägergebundenen Synthese bedingen gleichzeitig deren Nachteile. Während bei der trägerfreien Darstellung von Oligonucleotiden nach jedem Syntheseschritt eine Reinigung und Isolierung des Kondensats erfolgen kann, ist dies bei der trägergebundenen Synthese nur bedingt möglich, da die nicht umgesetzten 5'OH-Komponenten während der Synthese am Träger immobilisiert bleiben und erst nach der Synthese entfernt werden können. Obwohl 5'OH-Komponenten nach jeder Kettenverlängerung blockiert werden (capping) und damit die Entstehung von Falschsequenzen weitgehend verhindert wird, bleibt doch das Problem der chromatographischen Abtrennung dieser Rumpfsequenzen vom Syntheseprodukt nach dem Abspalten der Oligonucleotide vom Träger. Je länger die am Träger synthetisierte Oligonucleotidkette wird, umso aufwendiger (ab etwa 16 Monomereinheiten) wird das Abtrennen dieser Sequenzen, da das chromatographische Verhalten von unterschiedlich langen Oligonucleotiden mit steigender Kettenlänge immer ähnlicher wird. Um diesem prinzipiellen Nachteil der trägergebundenen Synthese entgegenzuwirken werden möglichst hohe Reaktionsumsätze pro Kettenverlängerungsschritt angestrebt. M. Gait berichtet z. B. über Umsätze von 80 - 90 % bei der Synthese von octa- und dodecameren Oligodesoxyribonucleotiden [22] durch Monomeraddition. Vor allem in der trägergebundenen Triestermethode wird dem Problem des Abtrennens kürzerer Sequenzen vom Hauptprodukt aber auch dadurch begegnet, daß der Aufbau der Oligonucleotidkette mit vorher trägerfrei dargestellten Nucleotidblöcken durchgeführt wird.

Hierdurch wird allerdings der Vorteil der trägergebundenen Synthese geschmälert. Die Blockaddition bringt den Vorteil, daß weniger Kondensationsschritte erforderlich sind und sich die Rumpfsequenzen chromatographisch stärker vom Hauptprodukt unterscheiden, wodurch eine einfachere Abtrennung möglich wird. Die mit der Blockaddition erzielten Reaktionsumsätze sind dagegen fast durchweg geringer, als bei einer Addition von Monomeren. Sie betragen bspw. bei der Synthese von Dodeca- und Heptadecanucleotiden, die durch Addition dimerer Nucleotidblöcke aufgebaut werden 60 - 80 % [23), 24)]. Andere Autoren berichten von ca. 85 % Umsatz bei der blockweisen Kondensation von Penta- und Hexadecanucleotiden [17)] mit Hilfe von Dimeren. Werden hingegen trimere Blöcke eingesetzt sinken die Umsätze weiter. Im Fall der Synthese von $d(T)_{25}$ sollen sie 50 - 70 % betragen [25)].

Das Prinzip einer Oligonucleotidsynthese mit der trägergebundenen Triestermethode wird in Schema 3 beschrieben. Der experimentelle Ablauf wird wie folgt durchgeführt (vgl. Fig. 8).
Die Kettenverlängerungsschritte 1⟶2 (vgl. Fig. 8) finden im verschlossenen Reaktionsgefäß statt, wobei alle anderen an der Reaktion beteiligten Komponenten (Träger, Kondensationsmittel, Pyridin und zu immobilisierende Komponente) zuvor von jeglicher Feuchtigkeit befreit werden (Reaktion 8⟶1). Nach erfolgter Kondensation wird zunächst das "capping" vorgenommen (Reaktion 2⟶3). Anschließend werden die 5'Hydroxylgruppen der am Träger verlängerten Oligonucleotide durch Detritylierung (Reaktion 5⟶6), begleitet von vorangehenden 3⟶5 und nachfolgenden 6⟶8 Waschschritten für den nächsten Kondensationsschritt vorbereitet.

Die in der Literatur beschriebene trägergebundene Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden mit Hilfe der Triestermethode ist in Tab. 5 zusammengefaßt. Als Träger werden Porenglas [26)], Silicagele [27)], Polymere auf Acryl- [22)] und Styrolbasis [28)] sowie Cellulose verwendet. An die funktionelle Gruppe der Träger (Amino- oder Hydroxylreste) wird der erste zu immobilisierende Baustein, der in der Regel ein speziell derivatisiertes geschütztes Nucleosid ist, kovalent gebunden. Die Beladung mit diesem Baustein ist je nach Trägertyp sehr unterschiedlich und liegt zwischen 40 µMol/g [26)] (Porenglas) und 280 µMol/g [22), 29)] (Polydimethylacrylamid- bzw. Chloromethylpolystyrolträger). Schwach vernetzte Träger (1 - 2 %)

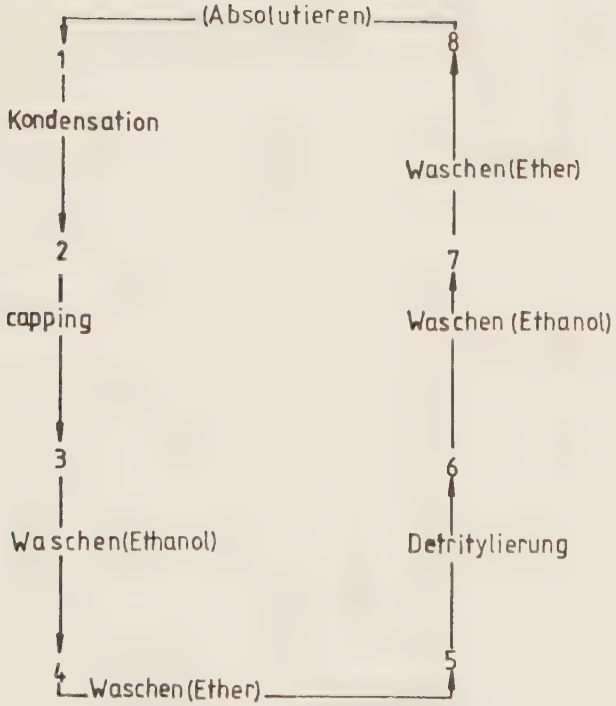
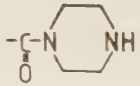
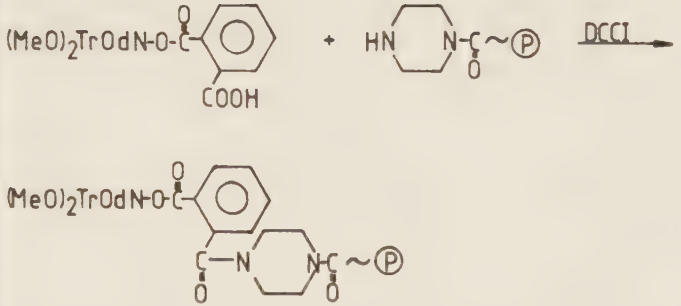


Fig. 8: Synthesezyklus zur trägergebundenen Darstellung (Triestermethode) von Oligonucleotiden.

Tab. 5: Bisher beschriebene Varianten (vgl. Spalte Literatur) zur Immobilisierung des ersten Bausteins von Oligonucleosidphosphaten am Träger

Trägertyp (Vernetzung in %)	Funktionelle Gruppe	Immobilisierung des ersten Bausteins am Träger Reaktion	Beladung (µMol/g)	Literatur
Porenglas	$-NH_2$	$(MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-fCl_5 + H_2N\sim(P) \longrightarrow$	40	26)
Polyacrylamid	$-NH_2$	$(MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\sim(P) + PCP$	180	31), 32), 33), 40), 41), 43)
Cellulose	$-OH$	$(MeO)_2TrOdN^2dU^{2-} + HO\sim(P) \longrightarrow (MeO)_2TrOdN^2dU^2O\sim(P)$	100	25)
Polydimethyl-acrylamid (6)	$-NH_2$	$[(MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-]_2O + H_2N\sim(P) \longrightarrow$ $(MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\sim(P)$ $+ (MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-COOH$	240 - 280	22), 23), 34), 35), 36)
Polystyrol (1)	$-NH_2$	$(MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-COOH + H_2N\sim(P) \xrightarrow{DCCI}$	100	12), 28)
Silicagel	$-NH_2$	$(MeO)_2TrOdN-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-(CH_2)_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH\sim(P)$	190 - 220	27)

Fortsetzung Tab. 5:

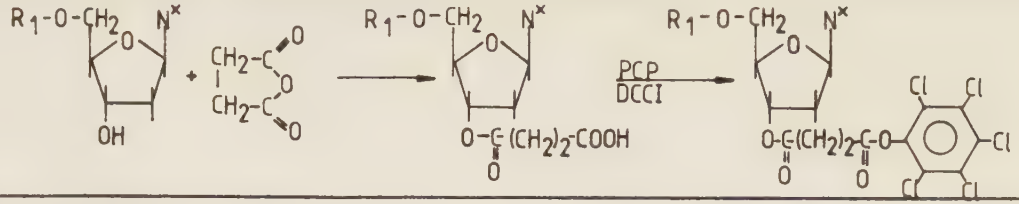
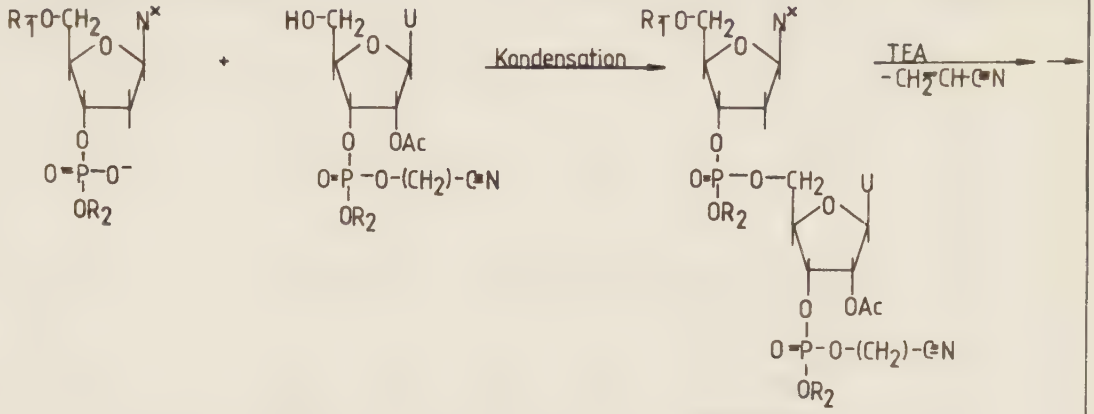
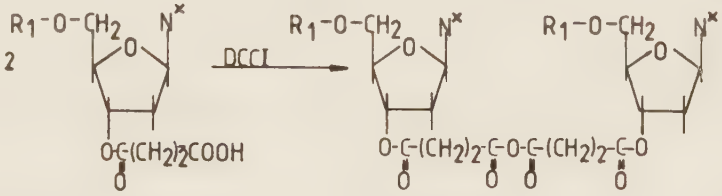
Trägertyp (Vernetzung in %)	Funktionelle Gruppe	Immobilisierung des ersten Bausteins am Träger Reaktion	Beladung (µMol/g)	Literatur
Polyacryl-morpholid			160	30)

wie Polydimethylacrylamid [22], Polystyrol [28] und Polyacrylmorpholid [30] sowie Silicagel [27] sind mit > 100 µMol/g an Monomerbausteinen beladbar. Neuerdings sind manche Autoren dazu übergegangen ihre Träger während der vollautomatisierten Oligonucleotidsynthese statt bspw. mit 280 µMol/g [22] nur noch mit 5 µMol Monomerbaustein [16] zu beladen.

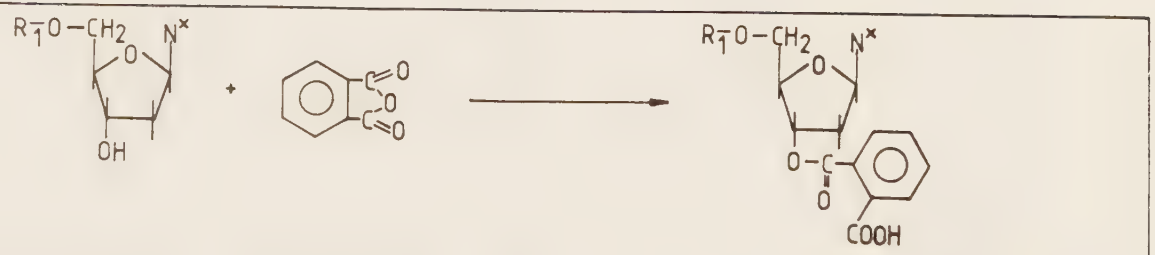
Die Synthese (vgl. Tab. 6) und Immobilisierung (vgl. Tab. 5) des ersten Bausteins am Träger ist auf verschiedenen Wegen möglich. Zunächst werden die Verfahren beschrieben, die zur Immobilisierung von $(MeO)_2$TrOdN an funktionelle Aminogruppen des Trägers angewandt werden. Das geschützte Desoxyribonucleosid $(MeO)_2$TrOdN wird zuerst mit Bernstein- [22), 26), 27), 28), 31)] bzw. Phtalsäureanhydrid [30] zum $(MeO)_2$TrOdN-3'-O-succinat bzw. -phtalat das an Kieselgel chromatographiert wird, umgesetzt. Die Succinyl- bzw. Phtalylreste erfüllen zwei Aufgaben. Sie dienen zum einen als Spacergruppe zwischen Trägermatrix und der aufgebauten Oligonucleosidphosphatkette, zum anderen ist die Esterbindung zwischen $(MeO)_2$TrOdN und Succinyl- bzw. Phtalylrest während der Synthese am Träger stabil, danach aber leicht alkalisch verseifbar, so daß die Oligonucleosidphosphate nach der Synthese ammonolytisch vom Träger gespalten werden können. Die Aktivierung der Carboxylgruppe von $(MeO)_2$TrOdN-3'-O-Succinat bzw. -phtalat zur Umsetzung der funktionellen Aminogruppe an der Trägermatrix erfolgt ebenfalls in mehreren Varianten. Die direkte Reaktion der Carboxylgruppe und der Aminogruppe wird mit Hilfe von DCCI erreicht [27), 28), 30)]. Nach Darstellung von z. B. Pentachlorophenyl 3'-(5'-O-Dimethoxytrityl Thymidityl)Succinat erfolgt die gleiche Umsetzung ohne Hilfe eines Kondensationsmittels [26), 32), 33)]. Eine weitere Variante besteht in der Darstellung des symmetrischen Anhydrids von $(MeO)_2$TrOdN-3'-o-Succinat mit Hilfe von DCCI und anschließender Umsetzung der aktivierten Komponente [23), 34), 35), 36)]. Nur 50 % des eingesetzten Nucleosidmaterials werden aber auf Grund des Reaktionsmechanismus zur Immobilisierung genutzt.

Wird Cellulose als Träger verwendet, deren Hydroxylreste als funktionelle Gruppen dienen, erfolgt die Immobilisierung des ersten Monomerbausteins zusammen mit dem als Ankergruppe dienenden Ribouridin-3'-Phosphat in Form eines dimeren Ribo-Desoxyribonucleotids [25].

Tab. 6: Darstellung des ersten am Träger zu immobilisierenden Bausteins

Trägertyp	Darstellung des ersten am Träger zu immobilisierenden Bausteins
Porenglas Polyacrylamid Polystyrol	
Cellulose	
Polydimethyl- acrylamid	

Fortsetzung Tab. 6

Polyacrylmorpholid	

Abkürzungen:

R_1^-, R_2^-, N^x: vgl. Schema 1; U=Uracil; TEA=Triethylamin;

DCCI=Dicyclohexylcarbodiimid; PCP = Pentachlorphenol

2.2. Voraussetzungen zur trägergebundenen Oligonucleotidsynthese im präparativen Maßstab

Die Ansatzgrößen der trägergebundenen Synthese sind prinzipiell limitiert, da verschiedene Syntheseschritte wie bspw. Kondensation und Detritylierung kinetisch kontrolliert ablaufen und mit unerwünschten Nebenreaktionen (bspw. Kettenbruch, Depurinierung) verbunden sind. Die zur Synthese eingesetzten Trägermengen bewegen sich daher zwischen 14 mg [22] und ca. 300 mg [33]. Bei Erhöhung der Reaktionsansätze ist die gewünschte Kinetik nicht gewährleistet, so daß die bewährten Synthesekonzepte für größere Ansätze modifiziert werden müßten. Hinzukommt, daß die schlechten Laufeigenschaften einiger verfügbarer Träger bei größeren Ansätzen zu Komplikationen führen. Größere Mengen an Oligonucleosidphosphaten werden derzeit nur durch mehrmalige Wiederholung des gesamten Synthesewegs dargestellt, womit eine Anhäufung von Falschsequenzen verbunden sein kann, die ihrerseits die Auftrennung des Synthesegemisches erheblich kompliziert. Erstrebenswert bei der trägergebundenen Darstellung präparativer Mengen an Oligonucleosidphosphaten ist daher die einmalige Durchführung der Synthese. Zu diesem Zweck sollte der Träger mit dem ersten zu immobilisierenden Baustein möglichst hoch beladen sein. Mit solchen Trägern könnte das bisherige Verfahren beibehalten und präparative Mengen synthetisiert werden.

In unserem Labor wurden Träger auf Acryl- [37] und Vinylsuccinatbasis [38] dargestellt, die sich zur präparativen Synthese von Oligonucleotiden mit der Triestermethode eignen. Zunächst wurden diese Träger auf ihre Beladbarkeit mit dem ersten zu immobilisierenden Baustein der geplanten Sequenz getestet. Darüberhinaus waren die beschriebenen und recht aufwendigen Methoden zur Immobilisierung des ersten Monomerbausteins (vgl. Tab. 5, 6) zu vereinfachen. Die beiden am höchsten mit Monomerbausteinen beladbaren Träger sollten dann in Testkondensationen verglichen werden. Der Träger, mit dem die besseren Umsätze bei Kettenverlängerungen zu erzielen sind, sollte zur trägergebundenen Darstellung der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ eingesetzt werden.

2.3. Beladung von Polyvinylsuccinat-, Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid-, Polyacrylsäure-1-aminohexylamidgelen und derivatisierten Polyacrylsäure-1-aminohexylamidträgern mit Monomerbausteinen

Die folgenden Versuche wurden mit Polyvinylsuccinat [38], Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid, Polyacrylsäure-1-aminohexylamid und Derivaten von Polyacrylsäure-1-aminohexylamid als Trägermaterialien durchgeführt. Die einzelnen Träger werden im folgenden numeriert und sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Sie weisen verschiedene Vernetzungsgrade auf. Polyvinylsuccinat (Gel 6) und Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid (Gel 5) sind zu ca. 20 % vernetzt. Das Polyacrylsäure-1-aminohexylamid (Gel 1) wurde mit verschiedenen Vernetzungsgraden (5 - 32 %) dargestellt. Als vernetzende Komponente diente bei der Darstellung aller Träger Butandioldivinylether. Die Immobilisierung von Anker- und Spacergruppen an die Träger wurde beschrieben [39]. Zur Immobilisierung von Monomerbausteinen diente in der Regel Pyridin als Reaktionsmedium. Zu den Versuchen wurde jeweils ca. 1 g Trägermaterial eingesetzt. Die Beladung der Träger mit Monomerbausteinen wurde photometrisch bestimmt (vgl. D. 9.2.).

Nachfolgende Versuche, deren Ergebnisse in Tab. 7 zusammengefaßt sind, wurden an einem 20 % vernetzten Derivat von Gel 1 (vgl. Tab. 8) dem Polyacrylsäure-(1-amino-N-succinoyl)-hexylamid (Gel 2 in Tab. 8) durchgeführt. Gel 2 erhält man aus Gel 1 durch Umsetzung mit Succinanhydrid [39].

Als einfachster Weg zur Immobilisierung des ersten Bausteins am Träger erschien uns die Aktivierung der Carboxylreste der Trägermatrix, die mit Hilfe verschiedener Reagenzien (Thionylchlorid, Oxalylchlorid und Acetylchlorid) in das entsprechende reaktive Carbonsäurechlorid überführbar sind. Die Reaktionen waren aber mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Es stellte sich heraus, daß die Umsetzungen noch am besten bei RT in Benzol, als inertem Lösungsmittel, durchführbar sind. Andere Bedingungen führten zu geschwärtzten Trägermaterialien. Weiterhin können so aktivierte Träger nur in absoluten Lösungsmitteln unter Feuchtigkeitsausschluß weiter umgesetzt werden, wodurch der experimentelle Aufwand erhöht wird. Die Immobilisierung der Monomerbausteine $(MeO)_2TrOdN$ über die Carbonsäurechloridreste der Trägermatrix von Gel 2, die bei RT in Benzol/Triethylamin 1:1 (v/v) durchgeführt wurde, erbrachte nur geringe Ausbeuten. Gele deren Carbonsäure-

Tab. 7*: Ergebnisse zur Immobilisierung von Nucleosiden an Gel 2 (vgl. Tab. 8, Vernetzungsgrad 20 %), dessen Carbonsäurereste in das entsprechende Carbonsäurechlorid überführt wurden. Die Bestimmung der Umsätze erfolgte photometrisch (vgl. D. 9.2.).

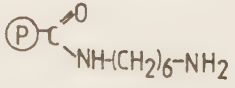
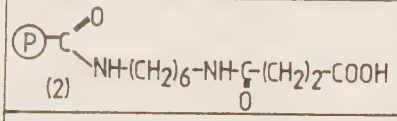
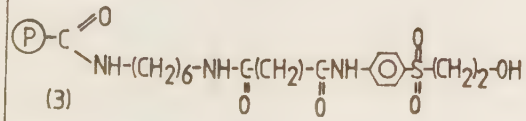
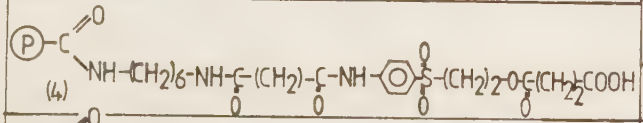
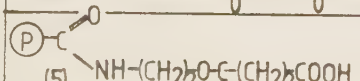
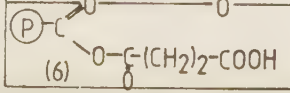
Reagenz Bezeichnung	Beladung mit $(MeO)_2$TrOdT (µMol/g)
Thionylchlorid	13,3
Oxalylchlorid	4,8
Succinyldichlorid	11,7

Aufgrund der mit diesen Versuchen erreichten äußerst geringen Beladung wurde auf die genaue Angabe der Reaktionsbedingungen verzichtet.

reste mit Thionylchlorid in die Säurechloride überführt wurden, ließen sich mit 13,3 µMol/g beladen. Die entsprechende Derivatisierung mit Oxalylchlorid erbrachte nur noch 4,8 µMol/g (vgl. Tab. 7). Bei der Verwendung von Acetylchlorid konnten überhaupt keine Ergebnisse erzielt werden.

Die Derivatisierung von Gel 1 (Vernetzungsgrad 20 %) mit Succinyldichlorid in Benzol bei RT und die nachfolgende Reaktion polymerer Carbonsäurechloride mit $(MeO)_2$TrOdT in Benzol/Triethylamin 1:1 (v/v) führte nur zu einer Beladung von 11,7 µMol/g (vgl. Tab. 7). Die Aktivierung der Carboxylgruppen des Trägers wurde auf Grund der unbefriedigenden Ergebnisse nicht weiter verfolgt.

Tab. 8: Ergebnisse der Immobilisierung des ersten Monomerbausteins an verschiedene Träger

Träger (Nr.)	Vernetzungsgrad (%)	eingesetzte Menge pro g Träger (µMol)	Beladung pro g Träger (µMol)	Umsatz (%)	eingesetzter Monomerbaustein Bezeichnung	Reaktion Nr.
 (1)	20	120	30	14,5	$(MeO)_2TrOdT^{\ddagger-}$	1
	5	170	140	82,0	$(MeO)_2TrOdT$-O-C(=O)-$(CH_2)_2$-C(=O)-O/Cl_5	2
	10	170	50	31,0		3
	20	170	35	20,2		4
	32	170	2	1,0		5
 (2)	20	470	50	10,4	$(MeO)_2TrOdT$	6
	5	470	130	28,3		7
 (3)	20	120	100	85,0	$(MeO)_2TrOdT^{\ddagger-}$	8
	20	250	150	62,4		9
	20	500	200	40,0		10
	20	500	150	30,4	$(MeO)_2TrOdanC$-O-C(=O)-$(CH_2)_2$-COOH	11
 (4)	20	500	250	49,6	$(MeO)_2TrOdanC$	12
	20	1000	280	27,4	$(MeO)_2TrOdT$	13
 (5)	20	630	300	49,2	$(MeO)_2TrOdanC$	14
	20	1000	300	29,7	$(MeO)_2TrOdT$	15
 (6)	20	1000	650	65,0	$(MeO)_2TrOdT$	16
	20	1400	730	51,0	$(MeO)_2TrOdanC$	17

Als Alternative wurde die Aktivierung der zu immobilisierenden Komponente versucht. Die Ergebnisse, sowie die verwendeten Träger sind in Tab. 8. zusammengefaßt. Die Bedingungen der in Analogie zu D. 9.1. durchgeführten Immobilisierung des ersten Monomerbausteins sind in Tab. 9 zu finden.

Folgende monomeren Bausteine standen zur Immobilisierung am Träger zur Verfügung.

1) Bariumsalze geschützter Desoxyribonucleotide $(MeO)_2TrOdN^{\ominus}$ $Ba^{2+}_{0,5}$

2) Geschützte Desoxyribonucleoside $(MeO)_2TrOdN$

3) Derivate geschützter Nucleoside (vgl. Tab. 6) z. B.
$(MeO)_2TrOdT\text{-}O\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}(CH_2)_2\text{-}COOH$ 3'-(5'-O-Dimethoxytrityl Thymidityl) Monosuccinat [41] oder $(MeO)_2TrOdT\text{-}O\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}(CH_2)_2\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}O\text{-}C_6Cl_5$ Pentachlorophenyl 3'-(5'-O-Dimethoxytrityl Thymidityl) Succinat

Zunächst wurde der Einfluß des Vernetzungsgrades des Trägers auf die zu erzielende Beladung untersucht. Zu diesem Zweck wurde Gel 1 in 5-, 10-, 20- und 32 %iger Vernetzung, Gel 2 dagegen (vgl. jeweils Tab. 8) in 5- und 20 %iger Vernetzung verwendet. Während an Gel 1 die Phosphatkomponenten $(MeO)_2TrOdT^{\ominus}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ und das Nucleosidderivat $(MeO)_2TrOdT\text{-}O\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}(CH_2)_2\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}O\text{-}C_6Cl_5$ immobilisiert werden können, ermöglicht Gel 2 auf Grund seiner funktionellen Carboxylreste die Immobilisierung geschützter Nucleoside $(MeO)_2TrOdT$. Phosphatkomponten wurden mit Hilfe von TPS/Tetrazol, geschützte Nucleoside mit TPS als Kondensationsmittel immobilisiert.

Die erzielten Ergebnisse (vgl. Reaktion Nr. 1 - 7 in Tab. 8) verdeutlichen den Einfluß des Vernetzungsgrades der Trägermatrix auf die Höhe der zu erzielenden Beladung. Die Matrix des 32 % vernetzten Gels 1 scheint auf Grund der minimalen Beladung von 2 µMol/g für Monomerbausteine nur geringfügig zugänglich zu sein (vgl. Reaktion Nr. 2 der Tab. 8). Unabhängig von der Art des zu immobilisierenden Bausteins konnten der 10 und 20 % vernetzte Träger dagegen mit 30 - 50 µMol/g beladen werden (vgl. Reaktion Nr. 1, 4 und 6 in Tab. 8),

Tab. 9: Zusätzliche Bedingungen zur Immobilisierung des ersten Monomerbausteins an die in Tab. 8 (Reaktion Nr. 1 - 17) aufgeführten Träger.

1. Monomerbaustein am Träger Bezeichnung	molarer Überschuß an TPS (Tetrazol) bezüglich Monomerbaustein xfach	Reaktionszeit (h)
$(MeO)_2TrOdN^{\oplus}$	3 (9)	3
$(MeO)_2TrOdN$	3	65
$(MeO)_2TrOdN\text{-}O\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}(CH_2)_2\text{-}O\text{-}fCl_5$	-	24
$(MeO)_2TrOdN\text{-}O\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}(CH_2)_2\text{-}COOH$	3	65

wobei die Umsätze zwischen 10 und ca. 30 % lagen. Die eindeutig besten Ergebnisse (130 - 140 µMol/g) wurden aber mit dem 5 % vernetzten Träger (vgl. Reaktion Nr. 2 und 7 in Tab. 8) erzielt. Hieraus folgt weiterhin, daß die zur Reaktion eingesetzte Menge an Monomerbausteinen in erster Näherung nur den Reaktionsumsatz, nicht aber die Höhe der Beladung beeinflußt.

Mit der Immobilisierung von Spacern an Gel 2 sollte versucht werden, die bisher erreichte Beladung von 140 µMol/g zu steigern. Zu diesem Zweck wurde das zu 20 % vernetzte Gel 2 mit p-Aminophenyl-2-hydroxyethylsulfon [42] als Spacer zu Gel 3 (vgl. Tab. 8) umgesetzt [39], dessen funktionelle Hydroxylgruppe die Immobilisierung von Phosphatkomponenten ermöglicht. Nach Veresterung der Hydroxylgruppe des Spacers mit Succinanhydrid [39] konnten geschützte Nucleoside $(MeO)_2TrOdN$ mit TPS als Kondensationsmittel an die Carboxylreste des erhaltenen Gels 4 (vgl. Tab. 8) immobilisiert werden. Die erzielte Beladung betrug hierbei 250 - 280 µMol/g (vgl. Reaktion Nr. 12 und 13 der Tab. 8). Die entsprechende Umsetzung an den nicht mit Spacer derivatisierten Gelen 1 und 2 des gleichen Vernetzungsgrades betrug dagegen nur 30 - 50 µMol/g (vgl. Reaktion Nr. 1, 4 und 6 der Tab. 8).

Als Alternative zur Immobilisierung von geschützten Nucleosiden als erstem Baustein am Träger kam dagegen die Immobilisierung geschützter Nucleotide aus zwei Gründen nicht in Betracht. Obwohl auf diesem Weg bis zu 200 µMol/g (vgl. Reaktion Nr. 8, 9 und 10 der Tab. 8) immobilisiert wurden, müssen hingegen die im Vergleich zu den geschützten Nucleosiden arbeitsintensiver darzustellenden Nucleotide eingesetzt werden. Weiterhin konnte die vollständige Abspaltung aller am Träger immobilisierten Nucleotide mit den zur Verfügung stehenden Reagenzien (NH_3conz., 1M NaOH, N^1,N^1,N^2,N^2-Tetramethylguanidinium) nicht erreicht werden. Die Immobilisierung von $(MeO)_2TrOdN^{2-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ wurde daher nicht weiter verfolgt.

Aus den bisher mit den Polyacrylsäurehexylamidgelen 1 - 4 erzielten Ergebnissen (vgl. Reaktion Nr. 1 - 13 in Tab. 8) folgt, daß sie mit bis zu 280 µMol/g beladen werden konnten, was den bisher höchsten beschriebenen Werten [22), 29)] entspricht. Dies war aber nur möglich, wenn zuvor aufwendig darzustellende Spacer [42] in mehreren Schritten [39] am Gel immobilisiert wurden.

Das von K. Itakura [41] eingeführte Konzept der Kondensation einer Carboxylgruppe am Träger mit der 3'Hydroxylgruppe von $(MeO)_2$TrOdN mit Hilfe von TPS erwies sich jedoch als ausbaufähig. Entgegen den Feststellungen von Itakura, es könne nur auf Thymidinderivate bei niedriger erreichbarer Beladung (140 µMol/g) angewendet werden, wurde bewiesen, daß es an unseren Trägern sowohl zu sehr viel höheren Beladungen als 140 µMol/g führen kann, als auch auf $(MeO)_2$TrOdanC anwendbar ist. Die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode auf alle Nucleoside wurde ebenfalls in unserem Labor gezeigt [44].

Bei folgenden Versuchen, die am Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid (Gel 5) und am Polyvinylsuccinat (Gel 6) (vgl. jeweils Tab. 8) durchgeführt wurden, erfolgte daher die Immobilisierung von $(MeO)_2$TrOdN als Monomerbaustein, der mit Hilfe von TPS an die Carboxylreste der Träger kondensiert wurde. Ohne weitere Einführung von Spacern konnten an diesen beiden Trägern bisher nicht beschriebene Beladungen erzielt werden. Während am Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid je 300 µMol/g $(MeO)_2$TrOdanC bzw. $(MeO)_2$TrOdT immobilisiert werden konnten (vgl. Reaktion Nr. 14 und 15 in Tab. 8) gelang es, das Polyvinylsuccinat mit 650 - 730 µMol/g zu beladen (vgl. Reaktion Nr. 16 und 17 in Tab. 8). Speziell beim Polyvinylsuccinat konnten darüberhinaus mit 51 bzw. 65 % hohe Reaktionsumsätze erzielt werden, die mit den bisher beschriebenen Methoden (vgl. Tab. 5) unerreichbar sind, da z. B. aktivierte Ester geschützter Nucleoside jeweils im 3 - 4fachen Überschuß bezüglich der funktionellen Gruppen am Träger eingesetzt werden [40].

Mit dem Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid und dem Polyvinylsuccinat standen damit zwei hochbeladbare leicht zugängliche Polymere zur Verfügung, deren Verwendbarkeit als Träger für die Oligonucleotidsynthese im folgenden untersucht wurde.

2.4. Durchführen von Testkondensationen

Zunächst wurden an den Gelen 4, 5 und 6 (vgl. jeweils Tab. 8), als den am höchsten beladbaren Trägern, Testkondensationen durchgeführt und der Einfluß von Spacern auf die Reaktionsumsätze untersucht. Der erste am Träger immobilisierte Baustein war jeweils danC. Die Beladung betrug 240 µMol/g an Gel 4, 300 µMol/g an Gel 5 und 730 µMol/g an Gel 6. Die Kondensationen erfolgten jeweils mit $(MeO)_2$TrOdanC$^{a^-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ zum

$(MeO)_2TrOdanC^{\textcircled{2}}danC\sim\textcircled{P}$ mit Hilfe verschiedener Kondensationsmittel, die in Tab. 11 zusammengefaßt sind. Die Phosphatkomponente $(MeO)_2TrOdanC^{\textcircled{2}-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ wurde im 2,5fachen, das jeweilige Kondensationsmittel im 15fachen molaren Überschuß bezüglich immobilisierter 5'OH-Komponente eingesetzt. Alle anderen Reaktionsbedingungen sowie die erzielten Reaktionsumsätze, die photometrisch bestimmt wurden (vgl. D. 9.2.), sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

Die mit Gel 5 erzielten Umsätze lagen mit allen in Tab. 11 aufgeführten Kondensationsmitteln unter 10 %. An Gel 4 und 6 wurden jeweils mit p-Toluolsulfonylnitroimidazol (TSNI) als Kondensationsmittel mit 50 bzw. 45 % die besten Reaktionsumsätze erzielt. Mit den anderen Kondensationsmitteln (TPS/Tetrazol, MSNT etc., vgl. Tab. 11) lagen die Umsätze nur zwischen 10 und 30 %. Die mit Gel 4 erzielten Ergebnisse lassen im Gegensatz zu den bei der Immobilisierung des ersten Monomerbausteins erzielten Resultaten (vgl. Reaktion Nr. 4 und 12 in Tab. 8) keinen Einfluß des Spacers auf die Umsätze der einzelnen Kondensationsschritte vermuten. Es wurde daher im folgenden nur das Polyvinylsuccinat (Gel 6) zur trägergebundenen Darstellung von Oligonucleosidphosphaten eingesetzt. Die mit dem Polyacrylsäure-(γ-succinoylpropyl)-amid erzielten Ergebnisse schienen nämlich die Vermutung zu bestätigen, daß eine zu hohe Anfangsbeladung nachfolgende Kondensationsschritte sterisch erschwert. Daher sollte die Beladung des Polyvinylsuccinats je nach Kettenlänge geplanter Oligonucleosidphosphate bis auf ca. 400 µMol/g reduziert werden. Diese Beladung liegt aber noch viel höher als bisher beschriebene (vgl. Tab. 5).

2.5. Synthese der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ an Polyvinylsuccinat

Als orientierender Versuch wird zunächst das Octanucleosidheptaphosphat $d(A_4C_4)$ an Polyvinylsuccinat (Beladung mit danC: 580 µMol/g) auf zwei Wegen anhand des Kondensationszyklus der Tab. 10 und den Bedingungen aus Tab. 12 dargestellt. Zunächst wird an 200 mg Träger mit Hilfe von Monoadditionsschritten $(MeO)_2TrOdanC^{\textcircled{2}}(danC^{\textcircled{2}})_2danC\sim\textcircled{P}$ aufgebaut. Als monomere Phosphatkomponente dient das Bariumsalz von $(MeO)_2TrOdanC^{\textcircled{2}-}$. Anschließend wird die eingesetzte Trägermenge in zwei Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wird schrittweise mit $(MeO)_2TrOdbzA^{\textcircled{2}-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$

Tab. 11: Ergebnisse der Testkondensationen, die an den Gelen 4, 5 und 6 (vgl. jeweils Tab. 8) mit verschiedenen Kondensationsmitteln anhand des Kondensationszyklus der Tab. 10 durchgeführt wurden. Die Kondensationen erfolgten jeweils mit der monomeren Phosphatkomponente $(MeO)_2TrOdanC^{a-}Ba^{2+}_{0,5}$, die im 2,5fachen molaren Überschuß bezüglich der am Träger immobilisierten 5'OH-Komponente eingesetzt wurde, zum Dinucleosidmonophosphat $(MeO)_2TrOdanC^{a}danC\sim$Ⓟ. Die Kondensationsmittel wurden im 15fachen molaren Überschuß bezüglich der 5'OH-Komponente am Träger eingesetzt. Die Bestimmung des Reaktionsumsatzes erfolgte photometrisch (vgl. D. 9.2.). Die mit Gel 5 erzielten Ergebnisse sind nicht aufgeführt, da die Umsätze durchweg unter 10 % lagen.

Gel Nr.	danC am Träger (µMol/g)	Kondensationsbedingungen Kondensationsmittel Bezeichnung	Reaktionszeit (h)	Umsatz (%)
4	290	TPS/Tetrazol [14]	4	11,8
		MSCl/Tetrazol [14]	4	30,5
		TSNI [5]	17	45,0
		MSNT [10]	4	18,6
6	730	TSNI	17	50,0
		TPS/Tetrazol	4	10,8

Tab. 10: Kondensationszyklus der trägergebundenen Synthese (Triestermethode)

Nr.	Schritt	Zahl der Durchführungen	Volumen (ml)	Lösungsmittel Reagenz	Zeit (min)
1	Kondensation	1 x	20 -	Pyridin Phosphatkomponente	340 - 400
2	Waschen	5 x	10 -	Pyridin -	5
3	Blockieren	1 x	30 10	Pyridin Acetanhydrid	60
4	Waschen	5 x	10 -	Pyridin -	5
5	Waschen	4 x	15 -	Ethanol -	10
6	Waschen	4 x	15 -	Ether -	10
7	Detritylierung	1 x	70	2 %ige Benzolsulfonsäure in $CHCl_3$/MeOH 6:4 (v/v)	3
8	Waschen	5 x	15 -	Ethanol -	10
9	Absolutieren	4 x	10	Pyridin	10

Tab. 12: Reaktionsbedingungen und Umsätze (vgl. 9 a) bei der Darstellung des Octanucleosidphosphats $d(A_4C_4)$ an 200 mg Polyvinylsuccinat. Zunächst wird $(MeO)_2TrOdanC^{\circ}(danC^{\circ})_2danC\sim\textcircled{P}$ in Monoadditionsschritten dargestellt. Die eine Hälfte der Trägermenge wird weiterhin in Monoadditionsschritten, die andere Hälfte dagegen blockweise mit dimeren Phosphatkomponenten zum Octanucleotid verlängert. Monomere Phosphatkomponenten werden in Form ihrer Bariumsalze, dimere dagegen als Triethylammoniumsalze eingesetzt. Bei den einzelnen Kondensationen, die jeweils in ca. 0,5 ml Pyridin ablaufen, wird das Kondensationsmittel TSNI im zehnfachen molaren Überschuß bezüglich der Phosphatkomponente eingesetzt.

trägergebundenes Oligonucleotid mit freier 5'Hydroxylgruppe		Phosphatkomponente			Zeit	Umsatz
Bezeichnung	in µMol*	Bezeichnung	in µMol*	(g)*	in h	in %
$danC\sim\textcircled{P}$	580	$(MeO)_2TrOdanC^{\circ-}$	1700	(1,50)	17	25,0
$danC^{\circ}danC\sim\textcircled{P}$	140	$(Meo)_2TrOdanC^{\circ-}$	430	(0,40)	15	89,3
$(danC^{\circ})_2danC\sim\textcircled{P}$	130	$(MeO)_2TrOdanC^{\circ-}$	380	(0,35)	19	75,2
$(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	100	$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ-}$	290	(0,26)	17	34,4
$dbzA^{\circ}(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	34,4	$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ-}$	120	(0,11)	19	77,5
$(dbzA^{\circ})_2(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	26,6	$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ-}$	90	(0,08)	18	89,0
$(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	23,7	$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ-}$	80	(0,07)	20	61,5
$(dbzA^{\circ})_4(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	14,6	—	-	-	-	-
$(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	100	$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}dbzA^{\circ-}$	290	(0,42)	18	14,0
$(dbzA^{\circ})_2(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	14,0	$(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}dbzA^{\circ-}$	40	(0,06)	20	96,9
$(dbzA^{\circ})_4(danC^{\circ})_3danC\sim\textcircled{P}$	13,6	—	-	-	-	-

* Alle Angaben in µMol und in g sind auf die Synthese an 1 g Polyvinylsuccinat umgerechnet (vgl. Fig. 9 a).

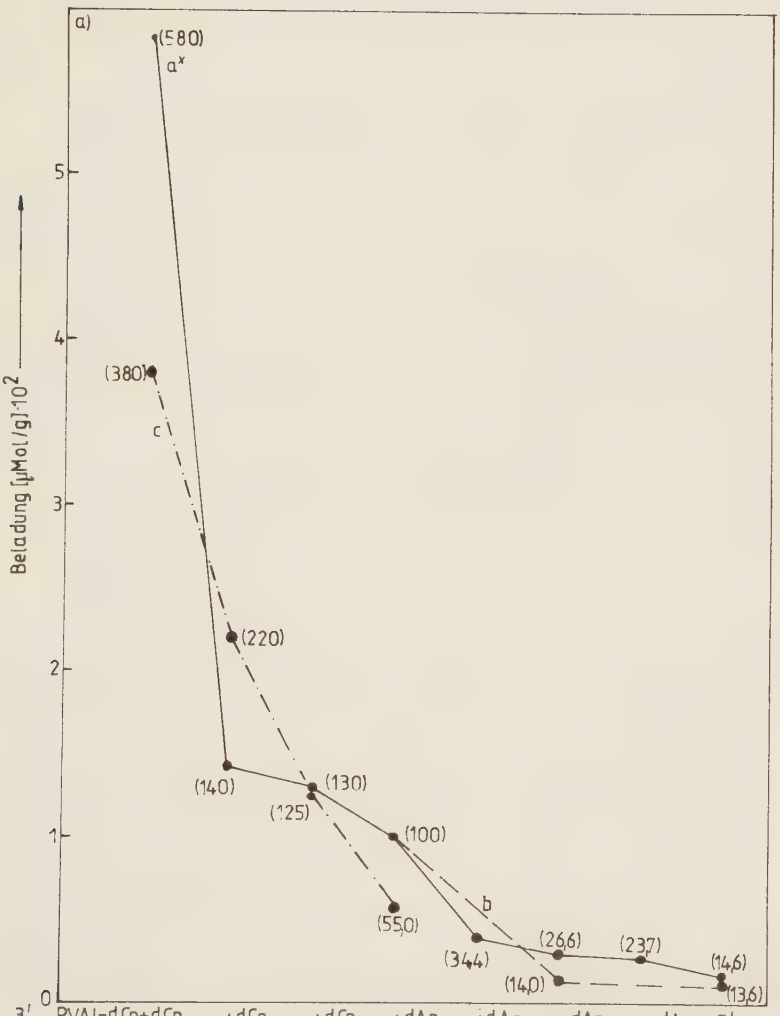
als Phosphatkomponente, die andere Hälfte blockweise mit $(MeO)_2TrO$ $dbzA^{ac}dbzA^{ac-}[NH(Et)_3]^+$ zum Octanucleosidheptaphosphat $(MeO)_2TrOdbzA^{ac}(dbzA^{ac})_3(danC^{ac})_3danC\sim Ⓟ$ verlängert. Die jeweiligen Umsätze der einzelnen Kettenverlängerungsschritte (auf die später eingegangen wird) sind in Tab. 12 zusammengefaßt und in Fig. 9 a) graphisch dargestellt. Beide Synthesewege führen in etwa zum gleichen Ergebnis. Das synthetisierte Octanucleosidphosphat $d(A_4C_4)$ verhält sich papierchromatographisch (Laufmittelsystem B) wie das trägerfrei dargestellte $d(A_4C_4)$ (Isolieren des Produkts vom Träger, Abspalten der Schutzgruppen, vgl. D. 9.4.).

Auf Grund dieses Ergebnisses wird die trägergebundene Darstellung von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ an 2,5 g Polyvinylsuccinat, die mit 950 µMol danC (380 µMol/g) beladen sind, anhand des Kondensationszyklus der Tab. 10 und den Reaktionsbedingungen aus Tab. 13 durchgeführt. Die ersten drei Kettenverlängerungsschritte der Synthese werden mit $(MeO)_2TrO$ $danC^{ac-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ vollzogen. $(MeO)_2TrOdanC^{ac}(danC^{ac})_2danC\sim Ⓟ$ wird danach mit $(MeO)_2TrOdanC^{ac}danC^{ac-}[NH(Et)_3]^+$ und $(MeO)_2TrOdbzA^{ac}dbzA^{ac-}[NH(Et)_3]^+$ zum Hexadecanucleotid $(MeO)_2TrOdbzA^{ac}(dbzA^{ac})_3(danC^{ac})_4(dbzA^{ac})_4(danC^{ac})_3$ $danC\sim Ⓟ$ verlängert, wobei auf der Stufe des Decanucleosidnonaphosphats $(MeO)_2TrOdanC^{ac}danC^{ac}(dbzA^{ac})_4(danC^{ac})_3danC\sim Ⓟ$ von einem Aliquot des Trägermaterials (150 mg) zur Überprüfung des Reaktionsverlaufs die immobilisierten Oligonucleotide abgespalten werden. Die letzte Kettenverlängerung erfolgt mit $(MeO)_2TrOdanC^{ac}(danC^{ac})_2danC^{ac-}[NH(Et)_3]^+$. Die bei den einzelnen Kondensationsschritten erzielten Reaktionsumsätze sind in Tab. 13 zusammengefaßt. Der Syntheseverlauf ist graphisch in Fig. 9 b) aufgezeichnet.

Bei der Darstellung von $(MeO)_2TrOdbzA^{ac}(dbzA^{ac})_3(danC^{ac})_3danC\sim Ⓟ$ und $(MeO)_2TrOdanC^{ac}(danC^{ac})_3(dbzA^{ac})_4(danC^{ac})_4(dbzA^{ac})_4(danC^{ac})_3danC\sim Ⓟ$ tritt mit zunehmender Kettenlänge der gleiche Abfall der jeweiligen Beladung mit Oligonucleosidphosphaten auf (vgl. Fig. 9 b)). Für die Reproduzierbarkeit beider Synthesen spricht der durchschnittliche Umsatz der bei der Darstellung des Eikosanucleosidphosphats 57 %, beim Aufbau des Octanucleosidphosphats 58 % beträgt. Insgesamt können nur 2,21 % und 0,15 % des anfangs am Träger immobilisierten danC zum Octameren bzw. Eikosameren verlängert werden. Die fast quantitativen Reaktionsumsätze, die bei der Kettenverlängerung des Dodecanucleosidundecaphosphats am Träger mit $(MeO)_2TrOdbzA^{ac}dbzA^{ac-}[NH(Et)_3]^+$ zum Tetradeca- bzw. Hexadecanucleotid auftreten, lassen vermuten, daß

Tab. 13: Reaktionsbedingungen und Umsätze (vgl. Fig. 9 b)) bei der Darstellung des Eikosanucleosidphosphats $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ an 2,5 g Polyvinylsuccinat. Die Synthese erfolgt hauptsächlich blockweise und nur z. T. in Monoadditionsschritten. Die einzelnen Kondensationsschritte werden jeweils in ca. 8 ml Pyridin durchgeführt. Monomere Phosphatkomponenten werden in Form ihrer Barium-, oligomere als Triethylammoniumsalze eingesetzt.

trägergebundenes Oligonucleotid mit freier 5'Hydroxylgruppe Bezeichnung		Phosphatkomponente			TSNI		Zeit	Umsatz
	in µMol	Bezeichnung	in µMol	(g)	in µMol	(g)	in h	in %
danC~Ⓟ	950	$(MeO)_2TrOdanC^{ø-}$	2300	(2,10)	19000	(5,20)	19	61,0
$danC^{ø}danC$~Ⓟ	580	$(MeO)_2TrOdanC^{ø-}$	1400	(1,30)	11000	(3,00)	19	54,4
$(danC^{ø})_2danC$~Ⓟ	320	$(MeO)_2TrOdanC^{ø-}$	780	(0,70)	6300	(1,70)	19	46,8
$(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	150	$(MeO)_2TrOdbzA^{ø}dbzA^{ø-}$	360	(0,52)	2900	(0,78)	19	30,0
$(dbzA^{ø})_2(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	45,0	$(MeO)_2TrOdbzA^{ø}dbzA^{ø-}$	110	(0,16)	880	(0,24)	19	34,0
$(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	15,3	$(MeO)_2TrOdanC^{ø}danC^{ø-}$	150	(0,21)	600	(0,16)	20	66,7
$(danC^{ø})_2(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	10,2	$(MeO)_2TrOdanC^{ø}danC^{ø-}$	100	(0,14)	400	(0,10)	20	51,3
$(danC^{ø})_4(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	5,2	$(MeO)_2TrOdbzA^{ø}dbzA^{ø-}$	100	(0,14)	820	(0,22)	20	92,8
$(dbzA^{ø})_2(danC^{ø})_4(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	4,8	$(MeO)_2TrOdbzA^{ø}dbzA^{ø-}$	190	(0,27)	760	(0,20)	20	97,1
$(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_4(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	4,7	$(MeO)_2TrOdanC^{ø}(danC^{ø})_2$ $danC^{ø-}$	190	(0,47)	740	(0,20)	22	39,8
$(danC^{ø})_4(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_4(dbzA^{ø})_4(danC^{ø})_3danC$~Ⓟ	1,9	-	-	-	-	-	-	-


a)
(580)
a^x
(380)
c
(220)
(140)
(130)
(125)
(100)
(55,0)
b
(344)
(26,6)
(23,7)
(14,6)
(14,0)
(13,6)
Beladung [µMol/g]·10^2
5
4
3
2
1
0
3'
PVAL-dCp
+dCp
+dCp
+dCp
+dAp
+dAp
+dAp
+dAp
5'
Umsatz in
25,0
89,3
75,2
34,4
77,5
89,0
61,5
a^x %
14,0
96,9
b %
57,8
56,8
44,0
c %

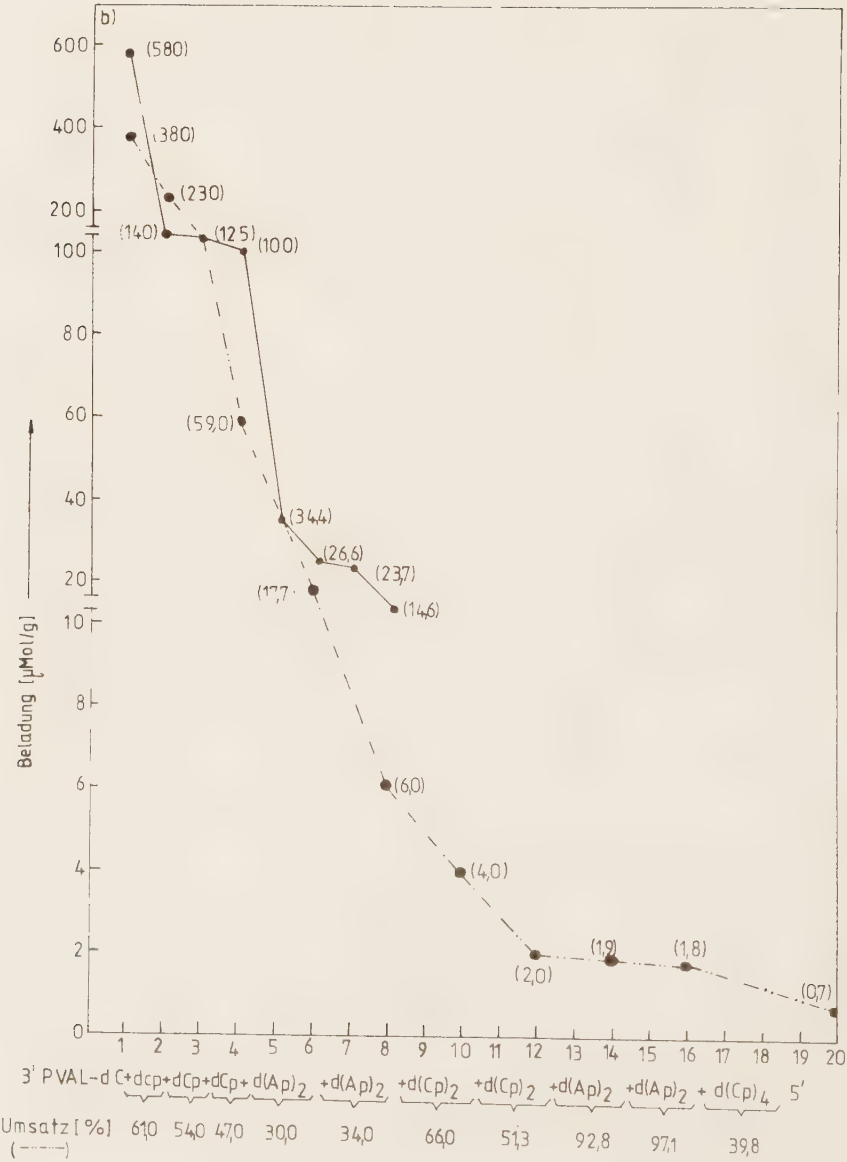


Fig. 9 a), b):

Ergebnisse der trägergebundenen Synthese (Triestermethode) von $d(C_4)$ (•-·-·-•), $d(A_4C_4)$ (•——•, Monoadditionsschritte; •– – –•, blockweise) und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ (•-·-·-•) an vernetztem Polyvinylsuccinat (vgl. Tab. 12 und 13). Die Schutzgruppen sind in den Sequenzen (Abszisse) nicht eingezeichnet.

die Oligonucleotide ab Kettenlänge 12 aus der Polymerstruktur "herausgewachsen" sind und somit der weiteren Kettenverlängerung keine sterischen Hinderungen mehr entgegenstehen. Der geringe Reaktionsumsatz des letzten Syntheseschritts dürfte hingegen auf die verminderte Reaktivität tetramerer Phosphatkomponenten zurückzuführen sein.

2.5.1. Entfernen der Schutzgruppen, Abspalten der Oligonucleosidphosphate vom Träger

Die Dimethoxytritylgruppe wird bereits nach dem letzten Kondensationsschritt zur Messung des Reaktionsumsatzes entfernt. Die p-Chlorphenylschutzgruppen werden mit N^1,N^1,N^2,N^2-Tetramethylguanidinium und Nitrobenzaldoximat (0,3 M Lösung) entfernt [10]. Gleichzeitig spaltet dieses Reagenz die Esterbindung zwischen den Oligonucleosidphosphatketten und der Trägermatrix. Anschließend werden Basenschutzgruppen mit conz. NH_3 abgespalten.

2.6. Reinigen der entschützten Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

2.6.1. Papierchromatographische Vorreinigung

Die vom Träger isolierten Oligonucleotide werden jeweils zunächst 24 h im Laufmittelsystem A chromatographiert. Hierdurch können dunkel gefärbte Verunreinigungen abgetrennt werden. Die danach auf der Startlinie des Papierchromatogramms verbliebenen Nucleotide $d(A_4C_4)$ und $d(C_2A_4C_4)$ werden weitere drei bis vier Tage im Laufmittelsystem B chromatographiert. Vom Octanucleosidphosphat $d(A_4C_4)$ können 2,4 A_{260}-Einheiten vom Decanucleosidphosphat $d(C_2A_4C_4)$ 8,0 A_{260}-Einheiten vom Papier eluiert werden. Es wird jeweils die stärkste UV - Bande auf dem Papierchromatogramm als Produkt bezeichnet. Das Eikosanucleosidphosphat wird dagegen zwei Wochen im Laufmittelsystem B chromatographiert. Danach werden 149 A_{260}-Einheiten aus der Region unterhalb der Referenz $d(C_4A_4C_4)$ bis zur Startlinie eluiert.

2.6.2. HPLC an Partisil 10 - SAX und Nucleosil 7 C_{18}

Die papierchromatographisch vorgereinigten Oligonucleotide werden mit Hilfe der HPLC auf Einheitlichkeit geprüft bzw. weiter gereinigt. Die Elutionsbedingungen und Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefaßt.

Tab. 14: Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung synthetischer Oligonucleosidphosphate mit Hilfe der HPLC an reverser Phase und Partisil 10 - SAX. Die Trennungen erfolgen jeweils an einer 250 x 4,6 mm Säule. Die Elution wird an reverser Phase mit einem Gemisch aus 0,01 M NH_4Ac (Eluent A) und Methanol/Wasser 6:4 (v/v) an Partisil 10 - SAX im linearen Gradienten [Eluent A: 0,001 M KH_2PO_4 in Formamid/Wasser 6:4 (v/v), Eluent B: 0,3 M KH_2PO_4 in Formamid/Wasser 6:4 (v/v)] durchgeführt.

Fig. Nr.	Oligonucleotid Bezeichnung	Nucleosil 7 µm C_{18} Eluent (% B)	Retentionszeit (min)	Gradientendauer (min)	Fig. Nr.	Partisil 10 - SAX Eluent (% B)	Substanz eluiert bei (% B) ≙ KH_2PO_4 (M)		Gradientendauer (min)
11 a)	$d(A_4C_4)$	30	14,2	21	10 a)	0 - 49	27,7	0,084	56
11 b)	$d(C_2A_4C_4)$	30	9,5	14	10 b)	0 - 75	43,6	0,130	81
13	$d(C_4A_4C_4A_4C_4)$	35 - 60	14,5	30	12 *	-	-	-	-

* (Vgl. D. 10.1.2.)

Mit einem Aliquot des Decanucleotids $d(C_2A_4C_4)$ und des Octanucleotids $d(A_4C_4)$ werden zuerst säulenchromatographische Trennungen an Partisil 10 - SAX durchgeführt. Die Elution erfolgt nach der von M. Gait [36] eingeführten Methode im linear steigenden Gradienten zwischen 0,001 M KH_2PO_4 (Eluent B) und 0,3 M KH_2PO_4 (Eluent B) jeweils in Formamid/Wasser 6:4 (v/v) pH 6,3. Das Octanucleosidphosphat $d(A_4C_4)$ wird mit 0,084 M KH_2PO_4 (28 % Eluent B), das Decanucleosidphosphat $d(C_2A_4C_4)$ mit 0,130 M KH_2PO_4 (43,5 % Eluent B) eluiert (vgl. Fig. 10).

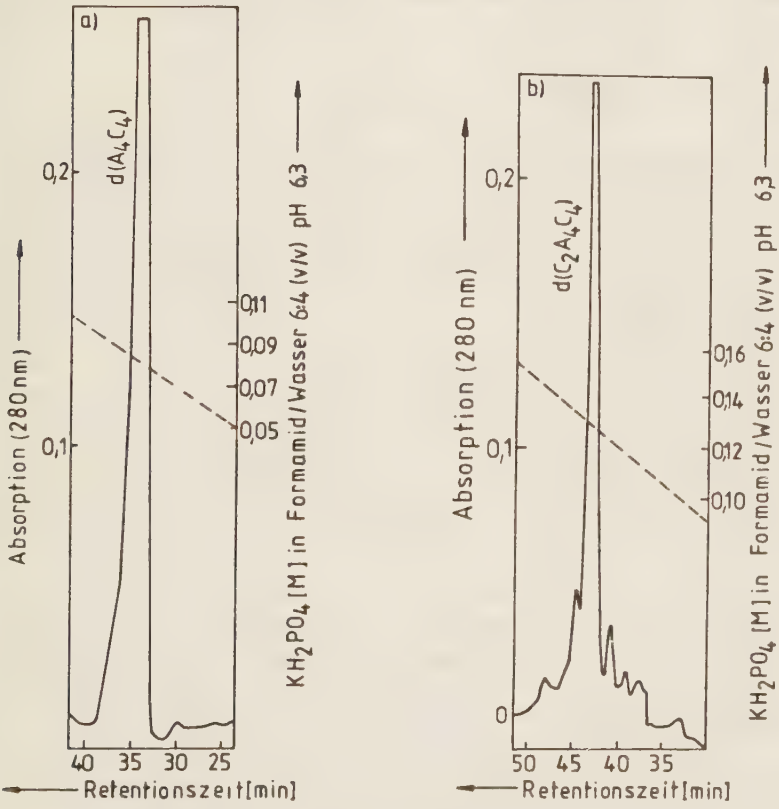


Fig. 10: Elutionsprofile der analytischen säulenchromatographischen Trennung der Oligonucleosidphosphate
a) $d(A_4C_4)$, b) $d(C_2A_4C_4)$.
Die Trennung erfolgt an Partisil 10 - SAX mit Hilfe der HPLC im steigenden Gradienten und den Bedingungen aus Tab. 14.

Beide Oligonucleotide erweisen sich als einheitlich bezüglich der Kettenlänge. Anschließend wird die Chromatographie der beiden Oligonucleotide an Nucleosil 7 C_{18} ebenfalls im analytischen Maßstab ausgeführt. Die Elution von der Säule erfolgt isokratisch mit B 30 %, einer Mischung aus 70 Volumenteilen 0,01 M NH_4Ac pH 7,5 und 30 Volumenteilen Methanol/Wasser 6:4 (v/v). Im Elutionsprofil von von $d(A_4C_4)$ (vgl. Fig. 11 a)) ist neben unspezifischen Verunreinigungen mit einer Retentionszeit von annähernd 0 nur ein nicht weiter aufzutrennender Hauptpeak zu erkennen. Dagegen werden bei der Reinigung von $d(C_2A_4C_4)$ verschiedene Nebenprodukte entfernt (vgl. Fig. 11 b)).

Bedingungen für die HPLC von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

In einem orientierenden Versuch werden zunächst mit Hilfe des trägerfrei dargestellten $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ die Elutionsbedingungen an Partisil 10 - SAX ermittelt. Unter diesen Bedingungen wird das vom Papier eluierte Oligonucleotidgemisch (149 A_{260}-Einheiten), in dem $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ vermutet wird, an Partisil 10 - SAX gereinigt. Aus dem unaufgelösten Elutionsprofil (vgl. Fig. 12) folgt, daß vom Partisil nur ein komplex zusammengesetztes Gemisch eluiert wird. Die Fraktionen ab 0,9 M KH_2PO_4, in denen $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ zu erwarten ist, werden vereinigt an Sephadex G-15 entsalzt und ergeben 24 A_{260}-Einheiten, die in der Homochromatographie untersucht werden. Je 0,01 vor und nach der Chromatographie an Partisil werden mit Hilfe von [γ-^{32}P]ATP und T_4 - Polynucleotidkinase phosphoryliert und anschließend homochromatographisch aufgetrennt (vgl. Fig. 14 a). Es wird deutlich, daß das in der Homochromatographie als unterste Bande laufende $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ nach Reinigung an Partisil nunmehr das Hauptprodukt des verbliebenen Oligonucleotidgemisches (Bahn 2 in Fig. 14 a)) darstellt. Kürzere Sequenzen (Bahn 1 in Fig. 14 a)) können größtenteils abgetrennt werden.

Ca. 0,4 A_{260}-Einheiten des von der Partisilsäule eluierten Oligonucleotidgemisches werden an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) im linear steigenden Gradienten von B 35 % bis B 60 % chromatographiert. Die Peaks 1, 2, 3 und 4 des erhaltenen Elutionsprofils (vgl. Fig. 13) werden homochromatographisch untersucht. Peak 1, 2 und 3 enthalten nicht phosphorylierbare unspezifische Verunreinigungen. Peak 4 kann anhand der schon in Fig. 14 a) benutzten Referenz als $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

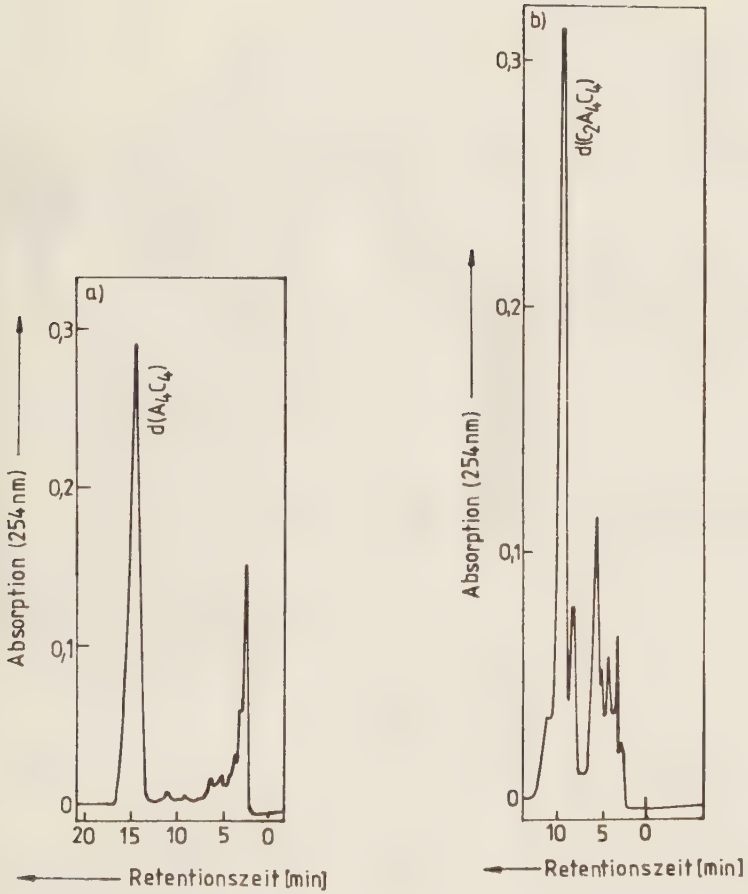


Fig. 11:

Elutionsprofile der analytischen säulenchromatographischen Trennung der Oligonucleosidphosphate a) $d(A_4C_4)$, b) $d(C_2A_4C_4)$. Die Trennung erfolgt isokratisch an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) mit Hilfe der HPLC und den Bedingungen aus Tab. 14. Die vollständige Identifizierung der in den Produktpeaks enthaltenen Oligonucleosidphosphate ist Fig. 4 - 7 (11 a)) und Fig. 15 - 17 (11 b))zu entnehmen.

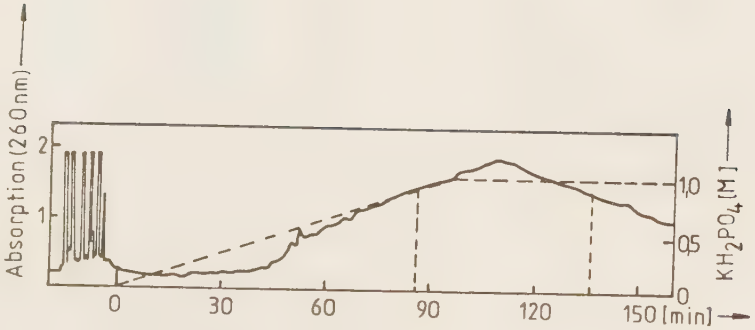


Fig. 12:

Elutionsprofil der präparativen säulenchromatographischen Trennung des vom Papier eluierten Oligonucleotidgemisches, das $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ enthält. Die Trennung erfolgt an Partisil 10 - SAX zunächst im linear steigenden Gradienten (Eluent A: 0,05 M KH_2PO_4, Eluent B: 1 M KH_2PO_4) und anschließend isokratisch (B 100 %). Fraktionen ab 90 % B werden gepoolt an Sephadex G-15 entsalzt und lyophilisiert.

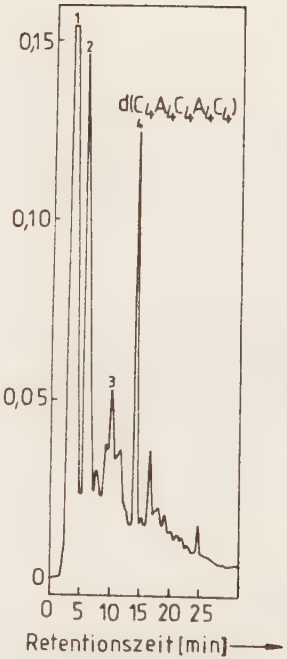


Fig. 13:

Elutionsprofil der analytischen säulenchromatographischen Trennung an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) des $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ enthaltenden Oligonucleotidgemisches, das nach Chromatographie an Partisil 10 - SAX erhalten wird (vgl. Fig. 12 und 14 a)). Die Elution erfolgt im linear steigenden Gradienten mit Hilfe der HPLC und den Bedingungen aus Tab. 14. Peak 4 wird als $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ (vgl. Fig. 14 b)) identifiziert.

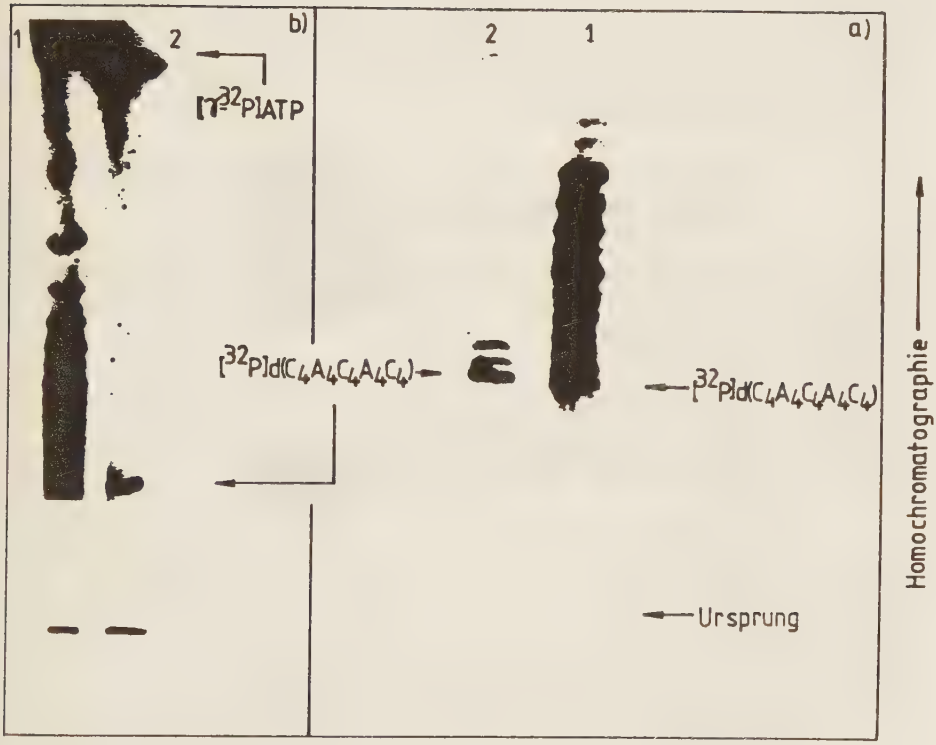


Fig. 14 a), b):

Homochromatographische Auftrennung $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ enthaltender Oligonucleotidgemische nach deren Markierung an den 5'Hydroxylgruppen mit Hilfe von [γ-^{32}P] ATP und T_4-Polynucleotidkinase. Bahn 1 in a) und b) zeigt die Zusammensetzung des vom Papier eluierten Oligonucleotidgemisches vor, Bahn 2 in a) nach der Chromatographie an Partisil 10 - SAX (vgl. Fig. 12). Bahn 2 in b) beweist die Isolierung von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ nach Chromatographie des an Partisil 10 - SAX erhaltenen Gemisches an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) (vgl. Fig. 13). Zur vollständigen Identifizierung von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ vgl. Fig. 16 und 17.

identifiziert werden (vgl. Fig. 14 b)). Aus Fig. 14 b) folgt, daß $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ mit HPLC aus dem nach Reinigung an Partisil erhaltenen Oligonucleotidgemisch (vgl. Bahn 2 in Fig. 14 a)) isoliert werden kann. Da die Fläche von Peak 4 nur einen Bruchteil der gesamten Peakflächen in Fig. 13 ausmacht folgt, daß das zur HPLC an reverser Phase eingesetzte Oligonucleotidgemisch noch zum größten Teil aus Verunreinigungen besteht.

2.7. Identifizierung der Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$

Das Octanucleosidheptaphosphat $d(A_4C_4)$ wird nur durch papierchromatographischen Vergleich mit dem in Lösung synthetisierten gleichen Produkt identifiziert.

Die vollständige Identifizierung des Decanucleosidnonaphosphats $d(C_2A_4C_4)$ und des Eikosanucleosidnonadecaphosphats $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ erfolgt mit den in C. 1.7. beschriebenen Methoden.

Das radioaktiv markierte $[^{32}P]d(C_2A_4C_4)$ wandert in der Homochromatographie als einheitliche Bande (vgl. Fig. 15). Das gleiche gilt für $[^{32}P]d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ (vgl. Fig. 14, Bahn 2). Die homochromatographische Auftrennung der mit den Bedingungen aus Tab. 17 dargestellten Partialhydrolysate unterbleibt beim $[^{32}P]d(C_2A_4C_4)$. Beim $[^{32}P]d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ gelingt dagegen die homochromatographische Auftrennung des Partialhydrolysats nicht. Die Kettenlänge kann damit zunächst nicht eindeutig bestimmt werden. Durch zweidimensionale Auftrennung der Partialhydrolysate des Decanucleosidphosphats und des Eikosanucleosidphosphats wird die Sequenz ermittelt (vgl. Fig. 16). In beiden Autoradiogrammen ist jeweils der oberste Fleck im Fingerprint aus technischen Gründen nicht zu sehen. Im Autoradiogramm des Eikosanucleosidphosphats gelingt die Auftrennung der vier pdC Bausteine des 3'Endes nicht. Beim Decanucleosidphosphat ergibt sich aus dem Gang der im sogenannten Fingerprint auftretenden Hauptflecken (vgl. Fig. 16 a_2)) die Sequenz zu $d(N\text{-}C\text{-}A_4C_4)$.

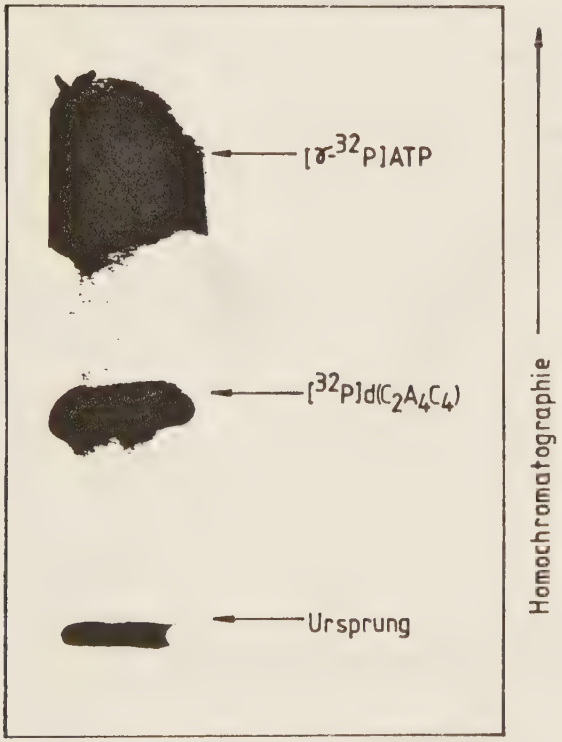


Fig. 15: Autoradiogramm des synthetischen Decanucleosidnonaphosphats $[^{32}P]d(C_2A_4C_4)$, das mit Hilfe von $[\gamma-^{32}P]$ ATP und T_4-Polynucleotidkinase an der 5'Hydroxylgruppe markiert und in der Homochromatographie aufgetrennt wird.

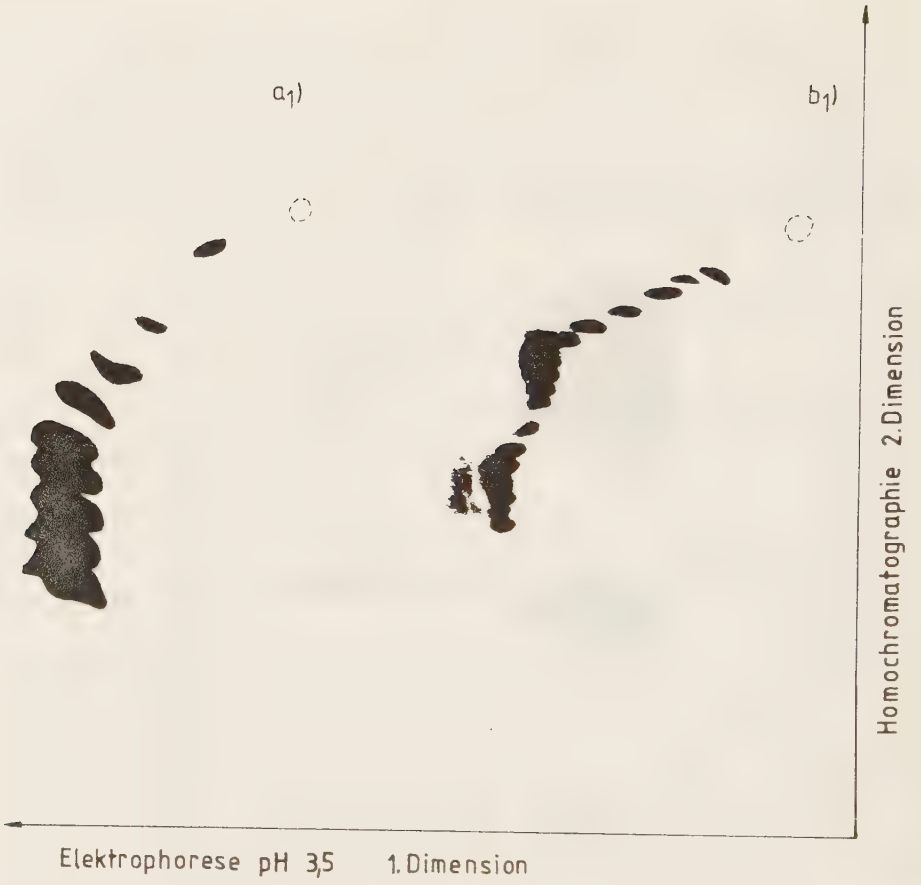


Fig. 16 a_1), b_1): Autoradiogramme nach der zweidimensionalen Auftrennung der Partialhydrolysate markierter synthetischer Oligonucleosidphosphate a_1) $[^{32}P]d(C_2A_4C_4)$; b_1) $[^{32}P]d(C_4A_4C_4A_4C_4)$. Die Partialhydrolysate werden in der 1. Dimension durch Elektrophorese bei pH 3,5 mit den Bedingungen aus Tab. 17, in der 2. Dimension homochromatographisch aufgetrennt, in 16 a_1) und b_1) ist jeweils der oberste Fleck im Autoradiogramm aus technischen Gründen nicht zu erkennen.

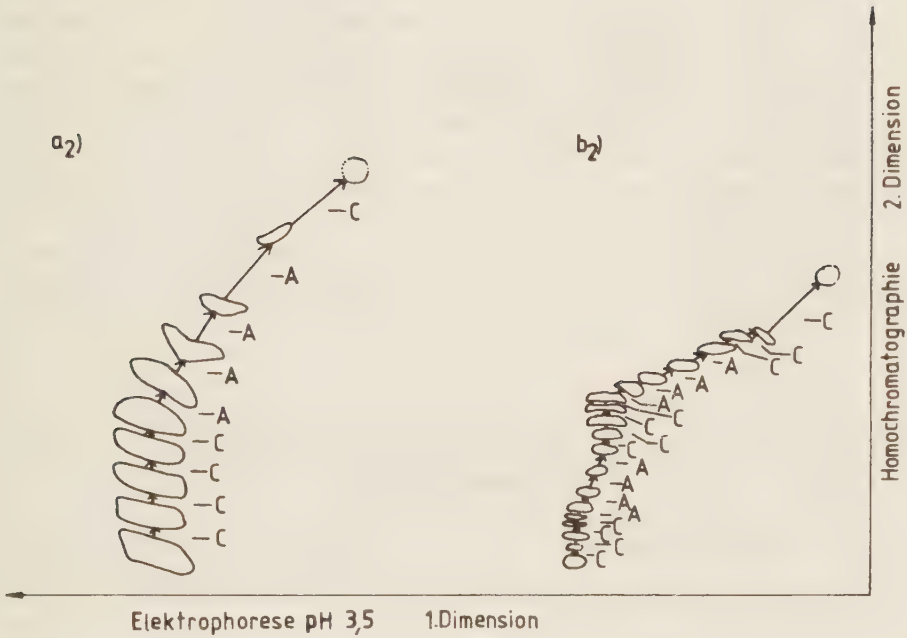


Fig. 16 a_2), b_2): Interpretation der Autoradiogramme aus Fig. 16 a_1) b_1)

Nach dem Gang der auftretenden Hauptflecken (vgl. Fig. 16 a_2) ergibt sich die Sequenz zu d(N-C-A_4C_4).

Der Gang der auftretenden Hauptflecken ist aus Fig. 16 b_1) zunächst nicht vollständig zu entnehmen. Vor allem der Bereich der letzten vier pdC Bausteine des 3'Endes ist undeutlich aufgelöst. Der Sequenzbeweis gelingt mit Hilfe des Autoradiogramms des Synthesezwischenprodukts d(N-C-A_4C_4), bei dem die betreffenden Nucleotidbausteine aufgelöst sind und unter Hinzuziehen des Autoradiogramms des trägerfrei dargestellten d($C_4A_4C_4A_4C_4$) (vgl. Fig. 6 d_1). Die Sequenz ergibt sich somit zu d(N-$C_3A_4C_4A_4C_4$) (vgl. Fig. 16 b_2).

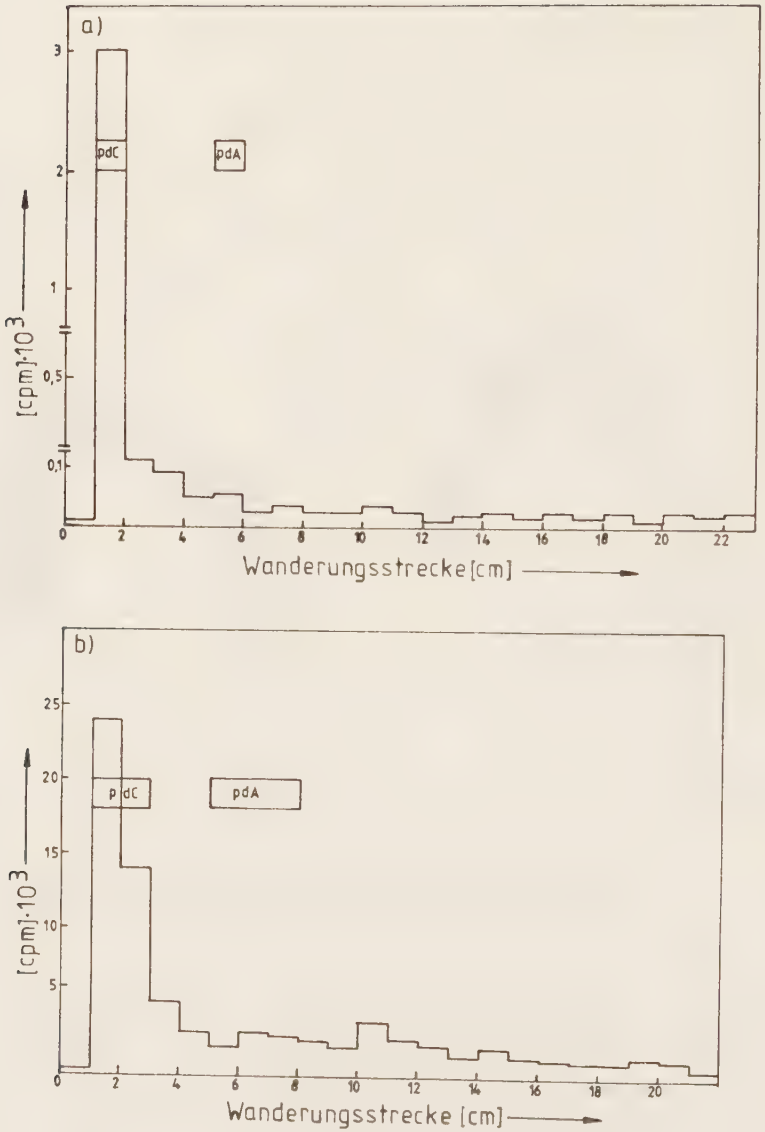


Fig. 17:

Aktivitätsprofile der Endgruppenbestimmung synthetischer Oligonucleosidphosphate a) $d(C_2A_4C_4)$; b) $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$. Eine Mischung von pdA und pdC sowie die von der DEAE - Platte eluierte Aktivität des obersten Flecks im Fingerprint werden papierelektrophoretisch aufgetrennt (2 h bei 4000 V). Durch Vergleich der Wanderungsstrecken in cm der Nucleotide und der Aktivität erkennt man in a) und b) jeweils $[^{32}P]dC$ als terminale Bausteine.

Die vom 3'Ende her undeutliche Auftrennung der ersten vier pdC-Bausteine im Autoradiogramm des Eikosanucleosidphosphats (vgl. Fig. 16 b_1) erlaubt zunächst keine eindeutige Sequenzbestimmung. Nach unserer Meinung ist es aber gerechtfertigt, die in dieser Region eindeutige Sequenz des Zwischenproduktes $d(N\text{-}C\text{-}A_4C_4)$ zu Hilfe zu nehmen und damit den Gang der Hauptflecken im Autoradiogramm mit $d(N\text{-}C_3A_4C_4A_4C_4)$ zu bezeichnen. Darüberhinaus sind im Autoradiogramm der zweidimensionalen Auftrennung des Partialhydrolysats von $d(N\text{-}C_3A_4C_4A_4C_4)$ etwas deutlicher als beim gleichen Produkt der trägerfreien Synthese (vgl. Fig. 6 d_1) und 16 b)) Verunreinigungen zu erkennen, die mit den bisher angewendeten chromatographischen Methoden nicht abgetrennt werden können.

Die papierelektrophoretische Bestimmung der 5'terminalen Bausteine führt im Fall des decameren und eikosameren Oligonucleosidphosphats zum gleichen Ergebnis. Die Wanderungsstrecke in cm von pdC und der jeweils von der DEAE - Celluloseplatte des Autoradiogramms eluierten Aktivität des obersten Flecks im Fingerprint stimmen überein. Die Sequenzen lauten damit $d(C_2A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ (vgl. Fig. 17).

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

1.1. Geräte

Fraktionssammler:	LKB 7.000 Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord L I
UV - Spektrometer:	Zeiss PMQ II
Lyophilisator:	Cont. Freeze Dryer, New Brunswick
Evapomix:	Buchler Instruments
Hochspannungselektrophorese:	High - Voltage - Electrophorator, Model D Gilson Med. Electronics
Schlauchpumpe:	Deuster, München
Vakuumzentrifuge:	Speed Vac Concentrator, Savant Instruments
Liquid-Szintillation-Spektrometer:	Packard Tri - Carb 3385
HPLC, Geräteeinheit 1:	V4A - Stahlsäule, Knauer Waters Pumpen 6.000 A, Programmer M 660, Injector U 6 K } Waters Königstein UV - Detector Model 836, Du Pont Instruments Zweikanalschreiber Servogor 25 Typ RE 571, Metrawatt GmbH
HPLC, Geräteeinheit 2:	Chromatographiesteuergerät CCM mit Rechnerintegrator 301, Spectro - Monitor III, Consta - Metric - Pumpen } LDC/Milton Roy
Tischzentrifuge:	M. Christ, Osterode

1.2. Materialien

Chemikalien

Toluol, Chloroform, n-Propanol, Ethanol, Methanol, Petrolether 30 - 50, Ether, $BaCl_2$, Na_2SO_4, P_4O_{10}, Benzol, Cyclohexan, NH_4HCO_3 und Benzoylchlorid werden in technisch reiner Form verwendet.

Pyridin wird einmal über KOH destilliert. Pyridin, das zur Kondensation verwendet wird, bleibt darüberhinaus über Molsieb 4 Å gelagert. Dioxan und Acetonitril werden einmal über CaH_2 destilliert. Triethylamin wird destilliert und über Molsieb 3 Å gelagert.

Gekaufte Chemikalien

Referenznucleotide pdA, pdC; Nucleoside dA, dC, dT (PWA Waldhof, Mannheim, BRD);

Dowex 50 WX 8 (H^+ - Form) (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD);

Cyanoethanol (3-Hydroxypropionitril); N^1, N^1, N^2, N^2 - Tetramethylguanidinium (Fluka AG, Buchs, Schweiz);

Benzolsulfonsäure (technisch 90 %); 1, 2, 4 - Triazol; Molsieb 4 Å (EGA - Chemie, Steinheim/Albuch, BRD);

Molsieb 3 Å, Typ 564; Glycerin; Dithioerithrol (Carl Roth OHG, Karlsruhe, BRD);

Harnstoff (Bayer AG, Leverkusen, BRD);

Röntgenfilme Curix RP 1 (AGFA - Gevaert, Stuttgart, BRD);

QAE - Sephadex A-25; Sephadex G-15 (Pharmacia, Uppsala, Schweden);

Kieselgel 60 (0,040 - 0,063 mm); DC - Fertigplatten (Kieselgel 60, F_{254}, Schichtdicke 0,25 mm); Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Merck, Darmstadt, BRD);

Nucleosil 7 µm C_{18} (für RP - HPLC); DEAE - Cellulose - DC - Folien (Polygram, Cel 300 DEAE/HR - 2/15) (Machery - Nagel, Düren, BRD);

Partisil 10 - SAX (Whatman Ltd., Maidstone, Kent, Great Britain);

Celluloseacetat - Streifen 550 x 30 mm; Chromatographiepapier Nr. 2316 (Schleicher & Schüll, Dassel, BRD);

[γ-^{32}P] ATP 3000 Ci/mMol (Amersham - Buchler, Braunschweig, BRD);

Enzyme

Phosphodiesterase aus Schlangengift (E.C.3.1.4.4.1.) (Boehringer, Mannheim, BRD);

T_4 - Polynucleotidkinase (Konzentration 3.000 U/ml) (Amersham - Buchler, Braunschweig BRD);

Synthetisierte Chemikalien

Dimethoxytritylchlorid $(MeO)_2TrCl$:

Die Darstellung des Dimethoxytritylcarbinols erfolgt analog[45] mit 91,5 g (0,5 Mol) Bromanisol und 85 g (0,4 Mol) p-Methoxybenzophenon als Ausgangsverbindungen. Das Carbinol wird nicht isoliert. Man gibt statt dessen 94 g Acetylchlorid zur Etherlösung, erhitzt 3 h unter Rückfluß und läßt das Produkt über Nacht im Kühlschrank auskristallisieren. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit wenig Ether gewaschen und über P_4O_{10} am Ölvakuum getrocknet. Ausbeute: 90,6 g = 67 % ≙ d.Th..

Monomethoxytritylchlorid (MeOTrCl):

Die Darstellung erfolgt in Analogie zu $(MeO)_2TrCl$, wobei p-Methoxybenzophenon durch Benzophenon ersetzt wird.

2, 4, 6 - Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid [46]

p-Toluolsulfonylnitroimidazol [5]

1H-Tetrazol [47]

4-Nitrobenzaldoxim [48]

Succinanhydrid [49]

o- und p-Chlorphenylphosphorodichloridat [50]

Anisoylchlorid [51], [52]

Rückgewonnene Chemikalien

Chloroform und Chloroform/Ethanol - Gemische, die bei der Säulentrennung an Kieselgel als Eluenten dienten, werden destilliert. Fraktionen bis 60° C Siedetemperatur werden zur Extraktion verwendet. Fraktionen ab 60° C werden als reines Chloroform bezeichnet und wieder zur Elution eingesetzt.

Petrolether/Ether - Gemische werden ebenfalls destilliert. Fraktionen zwischen 30 und 50° C werden abgenommen und wieder zur Fällung geschützter Oligonucleosidphosphate eingesetzt.

1.3. Puffer

Polynucleotidkinasepuffer: 2 ml 1 M Tris - HCl pH 8,1, 1 ml 1 M $MgCl_2$, 1 ml 0,1 M DTE, 5,5 ml Glycerin, 0,5 ml H_2O;
Schlangengiftphosphodiesterasepuffer: 100 µl 0,1 M $MgCl_2$, 100 µl 1 M Tris - HCl pH 8,1, 800 µl H_2O;
Puffer für Hochspannungselektrophorese:
Pyridin/Eisessig/Wasser 1:10:189 (v/v/v), pH 3,5.

1.4. Papierchromatographie

Die Papierchromatographie erfolgt absteigend auf Cellulosepapier Nr. 2.316 Schleicher & Schüll.
Laufmittelsystem A: Ethanol/ 1 M NH_4Ac, pH 7,5 7:3 (v/v).
Laufmittelsystem B: n-Propanol/conz. NH_3/Wasser 55:10:35 (v/v/v).

1.5. Dünnschichtchromatographie

Laufmittelsysteme: Chloroform/Ethanol 95: 5 (v/v)
Chloroform/Ethanol 90:10 (v/v)
abgekürzt 95:5 bzw. 90:10

1.6. Säulenchromatographie an Kieselgelsäulen

Das zum Sirup einrotierte Reaktionsgemisch wird in 50 ml Chloroform aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Zuerst eluiert man mit Chloroform bis die UV-Absorption des Eluats unter ca. 0,2 A_{260}-Einheiten gesunken ist. Nachfolgend wird mit Hilfe von Stufengradienten der Zusammensetzung Chloroform/Ethanol 98:2 (v/v) bis maximal 88:12 (v/v) weiter eluiert. Der Durchfluß (ca. 800 ml pro Stunde) wird hydrostatisch reguliert. Nach der Elution mit Chloroform werden Fraktionen von 16 - 17 ml gesammelt. Jede 10., bei Bedarf jede 5. Fraktion wird dünnschichtchromatographisch untersucht. Einheitliche Produktfraktionen werden auf ca. 20 ml eingeengt, aus 700 ml Petrolether/Ether 4:1 (v/v) gefällt, abgenutscht und am Ölvakuum getrocknet.

1.7. Allgemeines zur trägergebundenen Synthese von Oligodesoxyribonucleosidphosphaten

Als Phosphatschutzgruppe wird der p-Chlorphenylrest verwendet. Der Kondensationsschritt 1 (vgl. Tab. 10) des Reaktionszyklus wird im evakuierten Reaktionsgefäß, die anderen Schritte in einer G_4 - Fritte (ϕ ca. 6 cm) ausgeführt.

Die Synthese der Ankergruppe p-Aminophenyl-2-Hydroxyethylsulfon und ihre Immobilisierung an den unterschiedlich stark vernetzten Polyacrylsäurehexylamidgelen (vgl. Tab. 8, Gel 3 - 4) erfolgt analog [42] bzw. [39]. Die Umsetzung von Hydroxylresten am Träger mit Succinanhydrid, somit die Immobilisierung der Carboxylgruppe wird wie in [39] beschrieben durchgeführt. Die Immobilisierung der Aminogruppe an verschieden stark vernetzte Polyacrylsäurehexylamidgele entfiel, da die Träger in dieser Form zur Verfügung standen [37].

Die Darstellung von 3'-(5'-O-Dimethoxytritylcytidyl)Monosuccinat und Pentachlorophenyl 3'-(5'-O-Dimethoxytritylthymidityl)Monosuccinat ist beschrieben [41].

2. Einführen der Schutzgruppen

2.1. N^4 - Anisoyldesoxyribocytidin

5 g (21,9 mMol) Desoxyribocytidin werden dreimal mit je 50 ml wasserfreiem Pyridin zur Trockne abrotiert. Man gibt zuerst 100 ml wasserfreies Pyridin, dann 12 ml (84 mMol) Anisoylchlorid zu und rührt anfangs 15 min im Eisbad, dann 2 h bei RT jeweils unter Feuchtigkeitsausschluß. Anschließend wird mit DC das Ende der Reaktion festgestellt. Die Reaktion gilt als beendet, wenn die Ausgangskomponente dC aus dem Reaktionsansatz verschwunden ist. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird in 1.200 ml Wasser, in dem 80 g NH_4HCO_3 gelöst sind, gegeben. Nach Zugabe von weiteren 800 ml Wasser und 400 ml Ethanol erhitzt man die Suspension auf 70 - 80° C und stellt si anschließend über Nacht in den Kühlschrank. Danach nutscht man ab und wäscht mit 200 ml Ether nach. Das Filtrat wird verworfen. Das Produkt

(N^4, 3', 5' - Trianisoyldesoxyribocytidin) wird mit 140 ml Pyridin, 100 ml Methanol, 50 ml Wasser und danach 290 ml 2 N NaOH versetzt. Nach 15 min gießt man auf 600 ml Dowex 50 x 8 (H^+-Form) - Ionenaustauscher. Sobald sich unter Rühren pH 7 - 8 eingestellt hat, wird vom Dowex abgenutscht. Der Ionenaustauscher wird anschließend mit 700 ml Pyridin/Wasser 1:1 (v/v) nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden auf ca. 1,2 l einrotiert und dann viermal mit je 150 ml Ether ausgeschüttelt. Man rotiert weiter ein bis das Produkt ausfällt, nutscht ab und arbeitet die Mutterlauge weiter auf. Das Produkt wird am Ölvakuum über P_4O_{10} getrocknet. Ausbeute ca. 5,3 g ≙ 66 % d. Th..

2.2. N^6 - Benzoyldesoxyriboadenosin

10 g (40 mMol) Desoxyriboadenosin werden dreimal mit je 50 ml wasserfreiem Pyridin abrotiert. Nach Zugabe von 200 ml wasserfreiem Pyridin und 40 ml (345 mMol) Benzoylchlorid wird anfangs 10 min im Eisbad, danach 4 h bei RT jeweils unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Das Reaktionsende wird mit DC festgestellt. Die Umsetzung gilt als beendet, wenn die Ausgangskomponente dA aus dem Reaktionsansatz verschwunden ist. Anschließend gießt man auf eine Mischung aus 400 g Eis und 400 ml Chloroform und schüttelt aus. Nach zweimaligem Waschen der Wasserphase mit je 200 ml Chloroform, rotiert man die vereinigten Chloroformphasen zum Sirup ein und versetzt diesen unter Rühren mit 360 ml Pyridin, 240 ml Methanol, 120 ml Wasser und zuletzt mit 360 ml 2 NaOH. Nach 12 min gießt man auf 720 ml Dowex 50 x 8 (H^+-Form) - Ionen-Austauscher und nutscht bei Erreichen von 7,5 ab. Der Ionenaustauscher wird anschließend mit 500 ml Pyridin/Wasser 1:1 (v/v) nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden auf ca. 1,5 l einrotiert, anschließend viermal mit je 150 ml Ether ausgeschüttelt. Danach wird weiter einrotiert bis das Produkt ausfällt. Man nutscht ab, wäscht das Produkt mit etwas Ether nach und arbeitet die Mutterlauge auf. Das Produkt wird am Ölvakuum über P_4O_{10} getrocknet. Ausbeute 9,8 g ≙ 67 % d. Th., FP 104° C.

2.3. MeOTrOdanC, $(MeO)_2$TrOdanC und $(MeO)_2$TrOdbzA

20 mMol N^4 - Anisoyldesoxyribocytidin bzw. N^6 - Benzoyldesoxyriboadenosin werden dreimal mit je 30 ml wasserfreiem Pyridin zur Trockne abrotiert. Nach Zugabe von 50 ml wasserfreiem Pyridin und 20 ml $(MeO)_2$TrCl oder MeOTrCl wird 1 h unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Anschließend wird mit DC das Reaktionsende festgestellt. Die Reaktion gilt als beendet, wenn die Ausgangskomponente aus dem Reaktionsansatz verschwunden ist und ein neuer tritylpositiver Fleck (vgl. D. 3.) entstanden ist. Der Reaktionsansatz wird mit 200 ml Chloroform und 200 ml 2 %iger wässriger $NaHCO_3$ - Lösung versetzt und ausgeschüttelt. Nach zweimaligem Waschen der $NaHCO_3$ - Lösung mit je 150 ml Chloroform und zweimaligem Waschen der vereinigten Chloroformphasen mit je 150 ml Wasser rotiert man die organische Phase zum Sirup ein. Der Sirup wird nach Zugabe von 30 ml Chloroform auf eine Kieselgelsäule aufgetragen (Säulenfüllung 25 x 5,5 cm). Zunächst wird die Säule mit ca. 2,5 l Chloroform gewaschen. Anschließend wird das Produkt mit ca. 2 l 95:5 eluiert, wobei Fraktionen zu 16 - 17 ml gesammelt werden. Einheitliche Produktfraktionen werden vereinigt und zur Trockne rotiert (Wasserbadtemperatur max. 30° C). Ausbeute ca. 95 % d. Th. ≙ ca. 12 g.

2.3.1. $(MeO)_2$TrOdT

4,9 g (20 mMol) Desoxyribotymidin werden dreimal mit je 50 ml wasserfreiem Pyridin abrotiert. Nach Zugabe von 20 ml wasserfreiem Pyridin und 7,1 g (21 mMol) $(MeO)_2$TrCl und einstündiger Reaktionszeit wird mit DC das Reaktionsende (vgl. D. 2.3.) festgestellt. Der Reaktionsansatz wird ausgeschüttelt (vgl. D. 2.3.), anschließend werden die vereinigten Chloroformphasen 1 h über 100 g Na_2SO_4 getrocknet. Die Chloroformphase wird zum Sirup rotiert, der in 400 ml Benzol gelöst wird. Man gibt zu dem bis zum Rückfluß erhitzten Benzol solange Cyclohexan hinzu, bis eine leichte Trübung bleibt. Das über Nacht im Kühlschrank auskristallisierte Produkt wird nach dem Abnutschen mit etwas Cyclohexan/Benzol 1:1 (v/v) gewaschen, danach am Ölvakuum getrocknet. Nach Aufarbeitung der Mutterlauge beträgt die Ausbeute 10 g ≙ 90 % d. Th. (F.P. 123 - 124° C).

2.4. Darstellung von $(MeO)_2TrOdanC^{2-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$, $MeOTrOdanC^{2-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$, $(MeO)_2TrOdbzA^{2-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ und $(MeO)_2TrOdT^{2-}$ $Ba^{2+}_{0,5}$ aus $(MeO)_2$ TrOdanC, MeOTrOdanC, $(MeO)_2$TrOdbzA und $(MeO)_2$TrOdT

Nach Zugabe von 4,15 g (60 mMol) 1, 2, 4 - Triazol und 8,4 ml (60 mMol) Triethylamin zu 100 ml wasserfreiem Dioxan versetzt man zuletzt mit 4,9 ml (30 mMol) o-Chlorphenyl- oder p-Chlorphenylphosphorodichloridat. Man rührt 30 min bei RT unter Feuchtigkeitsausschluß und nutscht anschließend vom entstandenen Niederschlag ab. Das Filtrat wird direkt auf das in der Zwischenzeit durch dreimaliges Abrotieren mit je 30 ml wasserfreiem Pyridin getrocknete geschützte Nucleosid (10 mMol) $(MeO)_2$TrOdbzA, $(MeO)_2$TrOdanC, MeOTrOdanC und $(MeO)_2$TrOdT gesaugt. Mittels DC wird das Reaktionsende nach ca. 45 min festgestellt. Die Reaktion gilt als beendet, wenn die Ausgangskomponente $(MeO)_2$TrOdN aus dem Reaktionsansatz verschwunden ist. Man versetzt mit 500 ml Wasser und gießt unter Rühren die klare Flüssigkeit in 2 l 1 %ige wässrige $BaCl_2$ - Lösung. Anschließend wird abgenutscht und das Produkt über P_4O_{10} am Ölvakuum getrocknet. Ausbeute 80 - 95 % d. Th.

2.5. N^4-Anisoyl-3'-O-benzoyldesoxyribocytidin

10 g (12,8 mMol) $(MeO)_2$TrOdanC werden dreimal mit je 40 ml wasserfreiem Pyridin abrotiert. Anschließend gibt man 100 ml wasserfreies Pyridin und 7,3 ml (64 mMol) Benzoylchlorid zu und rührt 1 h unter Feuchtigkeitsausschluß bei RT. Nach beendeter Reaktion (die Ausgangskomponente ist aus dem Reaktionsgemisch verschwunden) überführt man mit 100 ml Chloroform in einen Scheidetrichter und schüttelt mit 1 l 2 %iger wässriger $NaHCO_3$ - Lösung aus. Nach zweimaligem Waschen der Wasserphase mit je 150 ml Chloroform und zweimaligem Waschen der vereinigten Chloroformphasen mit je 150 ml Wasser rotiert man die organische Phase zum Sirup ein. Der Sirup wird zweimal mit je 70 ml Toluol abrotiert. Das im Sirup enthaltene $(MeO)_2$TrOdanC(Bz) wird in dieser Form nicht isoliert, sondern mit den Bedingungen aus D. 5. detrityliert. Beim Einrotieren der vereinigten Chloroformphasen fällt das Produkt aus. Man nutscht ab und arbeitet die Mutterlauge weiter auf. Einheitliche Produktfraktionen (DC) werden vereinigt und am Ölvakuum getrocknet. Ausbeute 5,8 g ≙ 80,7 % d. Th..

3. Kondensation der geschützten Nucleotide

Dinucleosidphosphate werden in Acetonitril, längere Nucleosidphosphate in Pyridin synthetisiert.

Die zu kondensierenden geschützten Verbindungen der Tab. 1 werden in wasserfreies Pyridin (Acetonitril) gegeben. Die Lösung wird durch wiederholtes Abrotieren (3 - 4mal) des entsprechenden Lösemittels im Ölpumpenvakuum absolutiert und zum Schluß auf das in Tab. 1 angegebene Reaktionsvolumen konzentriert. Vor jeder neuen Lösemittelzugabe wird das Reaktionsgefäß über eine mit Blaugel gefüllte Trockensäule belüftet. Das Kondensationsmittelgemisch TPS/Tetrazol (Methylimidazol statt Tetrazol bei Kondensationen in Acetonitril) wird auf einmal zugegeben. Danach wird sofort evakuiert und der verschlossene Reaktionsansatz während den in Tab. 1 angegebenen Zeiten bei RT gerührt. 15 min vor dem Reaktionsende entnimmt man ein Aliquot des Kondensationsansatzes und überprüft mit Hilfe der DC den Reaktionsablauf. Die Reaktion gilt als beendet, wenn sich die 5'OH-Komponente vollständig umgesetzt hat und ein neuer tritylpositiver Fleck entstanden ist (tritylierte Verbindungen werden durch Besprühen des Dünnschichtchromatogramms mit Perchlorsäure/Ethanol 1:9 (v/v) und der daraus resultierenden Rotfärbung [$(MeO)_2Tr$ - Gruppen] bzw. Gelbfärbung [MeOTr - Gruppen] identifiziert). Der Kondensationsansatz wird mit 200 ml Chloroform versetzt und mit 200 ml 2 %iger wässriger $NaHCO_3$ - Lösung ausgeschüttelt. Die Wasserphase wird zweimal mit je 100 ml Chloroform, die vereinigten Chloroformphasen zweimal mit je 150 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wird zum Sirup einrotiert, in 30 ml Chloroform aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Die Elution des Produkts erfolgt nach den Bedingungen in Tab. 2.

4. Cyanoethylierung

Cyanoethylierungen werden mit den in Tab. 3 zusammengefaßten Bedingungen in Pyridin durchgeführt. Das Reaktionsvolumen beträgt jeweils ca. 50 ml. Die Absolutierung des Reaktionsansatzes erfolgt mit Pyridin (siehe Vorschrift zur Kondensation in D. 3.). TPS, Tetrazol und Cyanoethanol werden nach erfolgter Absolutierung

auf einmal zugegeben.

Die Kondensation im verschlossenen Reaktionsgefäß erfolgt während der ersten fünf Minuten im Eisbad, danach bei RT. Sie dauert ca. 60 min. Nach 50 min wird mittels DC das Reaktionsende festgestellt. Die Reaktion gilt als beendet, wenn keine Phosphatkomponente mehr am Startpunkt der DC zu erkennen ist. Nach Ausschütteln des mit 200 ml Chloroform versetzten Reaktionsansatzes (siehe Vorschrift zur Kondensation in D. 3.) werden die vereinigten Chloroformphasen zum Sirup einrotiert, der anschließend zweimal mit je 50 ml Toluol abrotiert wird. Danach erfolgt Detritylierung wie in D. 5. beschrieben.

5. Darstellung von 5'OH-Komponenten durch Detritylierung

Zum pyridinfreien Oligonucleosidphosphat oder Nucleosid (je ca. 1 mMol) gibt man 160 ml Benzolsulfonsäure [2 %ige Lösung in Chloroform/Methanol 6:4 (v/v)]. Geschützte Oligonucleosidphosphate bzw. Nucleoside die Purine enthalten werden bei 0 - 5° C, solche, die nur aus Pyrimidinen aufgebaut sind, bei RT jeweils 3 min detrityliert. Während der Spaltung wird kräftig gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 300 ml 2 %iger wässriger $NaHCO_3$ - Lösung abgebrochen. Die Vollständigkeit der Detritylierung wird mit DC überprüft. Die Wasserphase wird abgetrennt und anschließend zweimal mit je 100 ml Chloroform gewaschen. Die vereinigten Chloroformphasen werden nach zweimaligem Waschen mit je 150 ml Wasser zum Sirup einrotiert, danach in 30 ml Chloroform aufgenommen. Die Aufarbeitung erfolgt auf zwei Wegen. Der Sirup von tetrameren und kürzeren 5'OH-Komponenten wird auf eine Kieselgelsäule aufgetragen, die nach den Angaben in Tab. 3 eluiert wird. Längere als tetramere 5'OH-Komponenten werden durch Ausfällen aus 1 l Petrolether/Ether 4:1 (v/v) von der Dimethoxytritylgruppe abgetrennt. Man nutscht anschließend ab und trocknet am Ölvakuum. Ausbeute ca. 95 % d. Th..

6. Decyanoethylierung

Man gibt 10 ml wasserfreies Pyridin und 10 ml trockenes Triethylamin zu ca. 1 mMol Oligonucleosidphosphat und rührt unter Feuchtigkeitsausschluß ca. 90 min bei RT. Das Reaktionsende wird dünnschichtchromatographisch festgestellt. Die Schutzgruppe gilt als abgespalten, wenn die Substanz am Startpunkt der DC sitzen bleibt. Anschließend wird das Triethylamin durch zweimaliges Abrotieren mit je 20 ml trockenem Pyridin entfernt.

7. Entfernen der Schutzgruppen bei in Lösung synthetisierten Oligonucleosidphosphaten

a) Basen-, Phosphatschutzgruppen und Benzoylschutzgruppen der 3'Hydroxylgruppe.

Man gibt 50 ml conz. NH_3 [17] zum Syntheseprodukt und läßt das Gefäß fünf Tage lang gut verschlossen bei RT stehen. Danach rotiert man auf 5 ml ein und lyophilisiert.

b) Entfernen der Tritylschutzgruppen

Zur Detritylierung werden 1 - 3 ml Eisessig/Wasser/Pyridin 14:1:3 (v/v/v) zum Lyophilisat gegeben. Man läßt bei RT stehen. Die Abspaltung einer Monomethoxytritylgruppe dauert 17 h, die Abspaltung einer Dimethoxytritylgruppe 6 h. Danach wird vorsichtig mit NH_3 neutralisiert. Anschließend rotiert man dreimal mit je 20 ml 5 %igem Ammoniak ab. Der Kolbeninhalt wird nun in 5 ml Wasser aufgenommen und daraufhin an einer Sephadex G-15 Säule (88 x 2,5 cm) chromatographiert. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden lyophilisiert.

8. Säulenchromatographische Trennung der teilweise oder vollständig entschützten Oligonucleosidphosphate $(MeO)_2TrOd(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$ und $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$

Durch Behandlung von 260 mg des Octanucleosidheptaphosphats $(MeO)_2TrOdbzA^{\circ}(dbzA^{\circ})_3(danC^{\circ})_3danC(Bz)$, 75 mg des Dodecanucleosidundeca-

phosphats $(danC^{ib})_4(dbzA^{ib})_4(danC^{ib})_3danC(Bz)$ und 1,1 g des Eikosanucleosidnonadecaphosphats $MeOTrOdanC^{ib}(danC^{ib})_3(dbzA^{ib})_4(danC^{ib})_4(dbzA^{ib})_4(danC^{ib})_3danC(Bz)$ mit conz. NH_3 (vgl. D. 7.) werden die Schutzgruppen bis auf die $(MeO)_2Tr$- bzw. MeOTr-Gruppe hydrolytisch entfernt. Die entschützten bzw. teilweise entschützten Oligonucleosidphosphate $(MeO)_2TrOd(A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4)$ werden jeweils in 200 ml 7 M Harnstoff auf eine QAE - Sephadex Säule (Säulenfüllung 25 x 2 cm) aufgepumpt, die anschließend mit 200 ml/h eluiert wird. Entsprechend wird mit dem Eikosanucleosidphosphat verfahren. Allerdings wird die Gesamtmenge in zwei Portionen von 380 mg und 720 mg aufgeteilt. Zunächst wird die Chromatographie mit der kleineren Portion durchgeführt, danach die größere Portion gereinigt.

Zuerst wird die Säule solange mit 0,15 M NaCl unter Zusatz von 7 M Harnstoff, das mit 0,05 M Tris auf pH 7,5 gepuffert ist, gewaschen bis die UV-Absorption des Eluats 0,1 A_{260}-Einheiten unterschreitet. Die weitere Elution der Säule erfolgt im linear steigenden Salzgradienten mit 2 l 0,15 M NaCl im Mischgefäß und 2 l 0,55 M NaCl im Vorratsgefäß. Die Lösungen in beiden Gefäßen sind unter Zusatz von 7 M Harnstoff hergestellt worden und mit 0,05 M Tris auf pH 7,5 gepuffert. Jede zehnte im Bedarfsfall jede fünfte oder sogar jede Fraktion wird bei 250, 260 und 280 nm spektralphotometrisch vermessen. Die hierdurch erhaltenen Meßwerte bei 260 nm werden graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Man erhält die Elutionsprofile der Fig. 18 a) - c). Fraktionen, die vor Beginn der Gradientenelution beim Waschen der Säule mit 0,15 M NaCl anfallen, sind nicht in den Elutionsprofilen eingezeichnet. Diese A_{260}-Einheiten werden ebenso wie die A_{260}-Einheiten nicht bezeichneter Peaks zu den Zwischenfraktionen gezählt. Die Ergebnisse der durchgeführten säulenchromatographischen Trennungen sind in Tab. 15 zu finden. Die identischen Ergebnisse beider mit $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$ durchgeführten Säulenläufe wurden zusammengefaßt.

8.1. Aufarbeitung der von den QAE Säulen eluierten Peakfraktionen

Die Peakfraktionen werden mit Wasser auf das dreifache Volumen verdünnt und jeweils auf eine QAE-Sephadex Säule (Säulenfüllung

(25 x 2 cm) aufgepumpt (Durchfluß 400 ml/h). Anschließend wird die Säule mit 1 l Wasser gewaschen. Danach wird mit 2 N NaCl die an QAE-Sephadex adsorbierte Substanz eluiert. Man konzentriert das Eluat bis Salz ausfällt, nutscht ab und entsalzt das Filtrat an einer Sephadex G-15 Säule (88 x 2,5 cm) in 5 ml Portionen. Die vereinigten Produktfraktionen werden auf 5 ml eingeengt und anschließend lyophilisiert. Tritylpositive Lyophilisate werden detrityliert (vgl. D. 7.). Durch papierchromatographischen Vergleich (Laufmittelsystem B) wurde Peak I der Fig. 18 c) als $d(C_4A_4C_4)$ identifiziert. Peak II der Fig. 18 c) war nicht einheitlich und nicht zuzuordnen. Peak III (Fig. 18 c)), als tritylpositiver Peak, wurde als Produkt betrachtet.

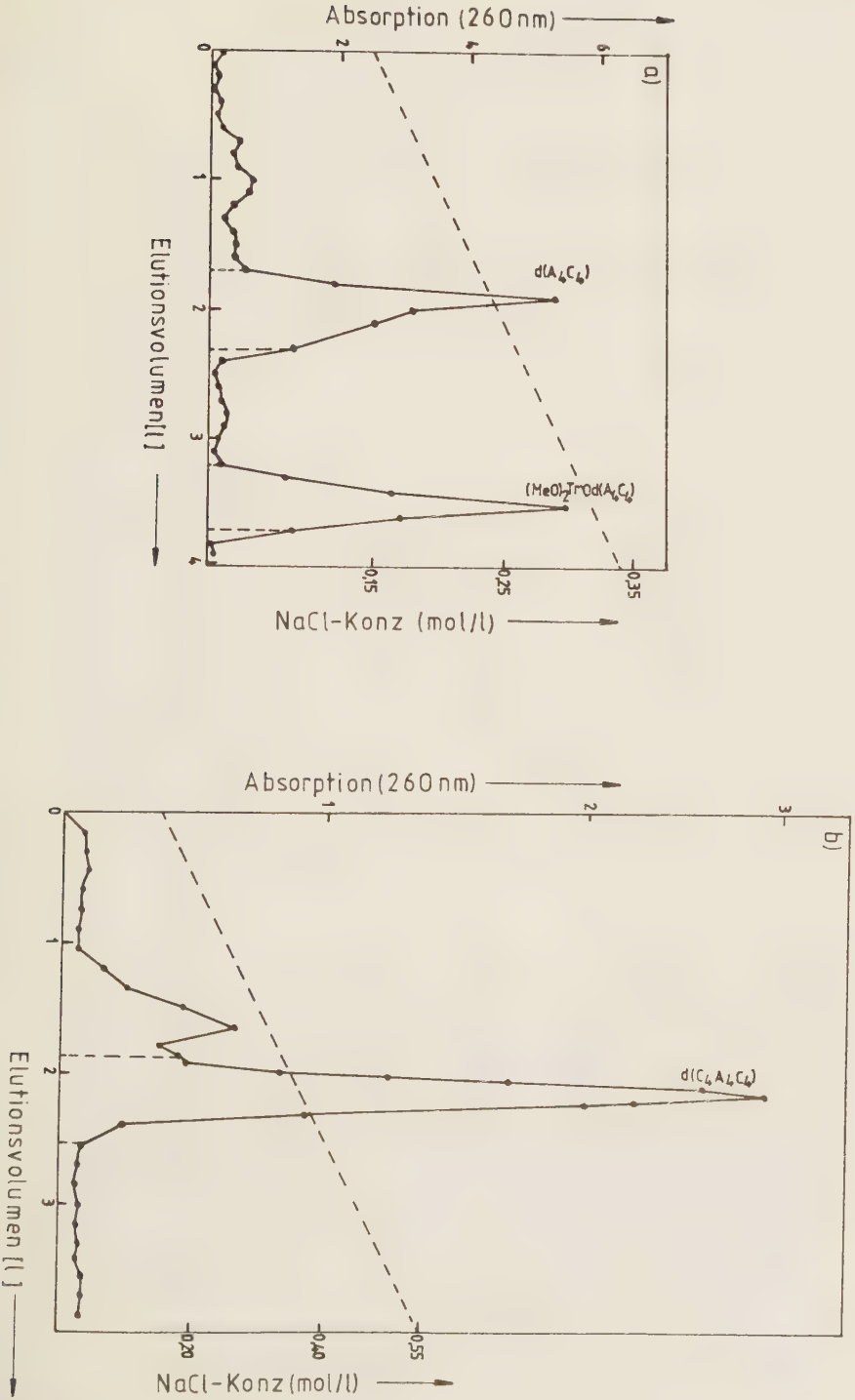
9. Trägergebundene Darstellung von Oligonucleosidphosphaten

9.1. Veresterung des ersten Monomerbausteins $(MeO)_2$TrOdN an die Trägermatrix

2 g trockenes Polyvinylsuccinat werden mit 60 ml wasserfreiem Pyridin versetzt. Über eine 10 cm lange Kolonne wird solange Pyridin abdestilliert bis die Siedetemperatur 113 - 114 ° C erreicht ist. Zu der erkalteten Lösung werden anschließend 2,86 mMol $(MeO)_2$TrOdN gegeben und das Gemisch wie unter D. 3. beschrieben mit Pyridin azeotrop getrocknet. Vor der letzten Pyridinzugabe werden 3,2 g TPS (10,5 mMol) auf einmal zugegeben. Danach wird die Reaktionslösung bis zur leichten Viskosität konzentriert. Man rührt ca. 70 h bei RT unter Feuchtigkeitsausschluß und führt danach die Schritte 4, 5 und 6 des Kondensationszyklus der Tab. 10 durch. Die Beladung mit Monomerbaustein/g Träger wird photometrisch bestimmt (vgl. D. 9.2.).

9.2. Bestimmung des Reaktionsumsatzes bei der trägergebundenen Synthese

Die Dimethoxytritylgruppe wird mit Schritt 7 der Tab. 10 abgespalten und mit Schritt 8 aus dem Träger gewaschen. Die Filtrate der Schritte 7 und 8 werden vereinigt und bis zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird in 20 ml Perchlorsäure/Ethanol 1:1 (v/v) aufgenommen. Man mißt die Absorption der Lösung bei 500 nm. Aus dem Meßwert wird mit Hilfe der Eichkurve aus Fig. 19 der Reaktionsumsatz bestimmt


Absorption (260 nm)
a)
Elutionsvolumen [l]
d(A4C4)
(MeO)2TrOd(A4C4)
NaCl-Konz (mol/l)
Absorption (260 nm)
b)
Elutionsvolumen [l]
d(C4A4C4)
NaCl-Konz (mol/l)

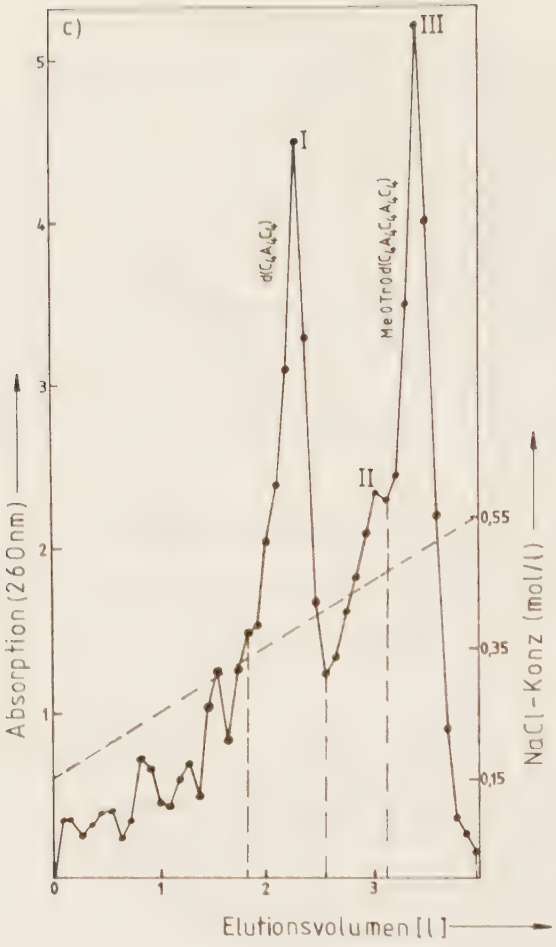


Fig. 18:

Elutionsprofile der säulenchromatographischen Trennung von Oligonucleosidphosphaten nach der Entfernung aller Schutzgruppen (Fig. 18 b)), bzw. deren Entfernung aus den Basenresten und Internucleotidbindungen (Fig. 18 a) und c)). Die Trennung erfolgt an QAE - Sephadex A-25 (Säulenfüllung 25 x 2 cm). Der Durchfluß beträgt 200 ml/h. Die Elution erfolgt unter Zusatz von 7 M Harnstoff bei RT mit den in der Figur gestrichelt eingezeichneten NaCl-Gradienten, der mit 0,05 M Tris - HCl auf pH 7,5 gepuffert ist. Fraktionen innerhalb der senkrechten Strichelung bezeichneter Peaks werden vereinigt und aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Trennungen sind in Tab. 15 zusammengefaßt.
18 a) Reinigung von $(MeO)_2TrOd(A_4C_4)$; 18 b) Reinigung von $d(C_4A_4C_4)$; 18 c) Reinigung von $MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$.

Tab. 15: Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennungen, die nach hydrolytischer Entfernung der Schutzgruppen bis auf die $(MeO)_2Tr$ - bzw. MeOTr - Gruppe mit den Oligonucleosidphosphaten $(MeO)_2TrOdbzA^{Ac}(dbzA^{Ac})_3(danC^{Ac})_3danC(Bz)$ (260 mg), $(danC^{Ac})_4(dbzA^{Ac})_4(danC^{Ac})_3danC(Bz)$, (75 mg) und $MeOTrOdanC^{Ac}(danC^{Ac})_3(dbzA^{Ac})_4(danC^{Ac})_4(dbzA^{Ac})_4(danC^{Ac})_3danC(Bz)$ (1100 mg) an QAE - Sephadex A-25 durchgeführt wurden. Das Eikosanucleosidphosphat wurde in zwei Portionen (380 und 720 mg) chromatographiert. Die Ergebnisse sind zusammengefaßt.

Fig.	Oligonucleotid	Eluiert bei NaCl - Konz.	Mengen eluiert		isoliert	
Nr.	Bezeichnung	(M)	A_{260}-Einh.	(%)	(mg)	(%)
18 a)	$d(A_4C_4)$	0,225 - 0,262	1560	28,8	60	23,0
	$(MeO)_2TrOd(A_4C_4)$	0,312 - 0,337	1040	19,2	40	15,4
	Zwischenfraktion	-	2800	51,8	-	-
18 b)	$d(C_4A_4C_4)$	0,350 - 0,375	450	24,3	22	32,1
	Zwischenfraktion	-	1400	75,0	-	-
18 c)	$d(C_4A_4C_4)$	0,350 - 0,411	5300	17,3	210	17,8
	nicht identifizierte Mischung	0,411 - 0,472	3400	11,1	140	11,9
	$MeOTrOd(C_4A_4C_4A_4C_4)$	0,472 - 0,555	5700	18,6	230	19,5
	Zwischenfraktion		16300	53,1	-	-

9.3. Kettenverlängerung am Träger

Beginnend mit Schritt 1 des Kondensationszyklus in Tab. 10 wird das Reaktionsgemisch absolutiert (vgl. D. 3.). Mit der letzten Pyridinzugabe wird TSNI auf einmal zugegeben. Daraufhin wird der Inhalt des Reaktionsgefäßes bis zur beginnenden Viskosität einkonzentriert und anschließend der Reaktionsansatz unter Feuchtigkeitsausschluß bei RT gerührt. Die Bedingungen zur Darstellung des Octanucleosidheptaphosphats $d(A_4C_4)$ und des Eikosanucleosidnonadecaphosphats $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ sind in Tab. 12 und 13 zusammengefaßt.

9.4. Entschützen und Abspalten der Oligonucleosidphosphate vom Träger

Man versetzt den Träger mit 6 ml einer an N^1,N^1,N^2,N^2-Tetramethylguanidinium und 4 - Nitrobenzaldoximat 0,3 M Lösung in Dioxan/Wasser 1:1 (v/v) und läßt 60 h bei RT stehen. Danach wird vom Träger abgenutscht und viermal mit je 10 ml H_2O nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden anschließend zum Sirup eingeengt. Man gibt 20 ml conz. NH_3 zum Sirup und läßt das verschlossene Gefäß fünf Tage bei RT stehen. Nach Abrotieren des NH_3 nimmt man in 50 ml H_2O auf und schüttelt fünfmal mit je 30 ml Chloroform aus. Die Wasserphase wird auf 2 ml einrotiert, danach lyophilisiert.

10. Reinigung synthetischer Oligonucleosidphosphate mit Hilfe der HPLC

Nicht erwähnte experimentelle Bedingungen sind in Tab. 16 die Ergebnisse und Elutionsbedingungen in Tab. 4 und 14 zusammengefaßt. Vom HPLC eluierte identische Fraktionen der durchgeführten Säulenläufe werden vereinigt, einrotiert, wenn nötig an Sephadex G-15 entsalzt und lyophilisiert. Bei der HPLC an reverser Phase wird Nucleosil 7 µm C_{18}, ansonsten Partisil 10 - SAX als Säulenmaterial verwendet.

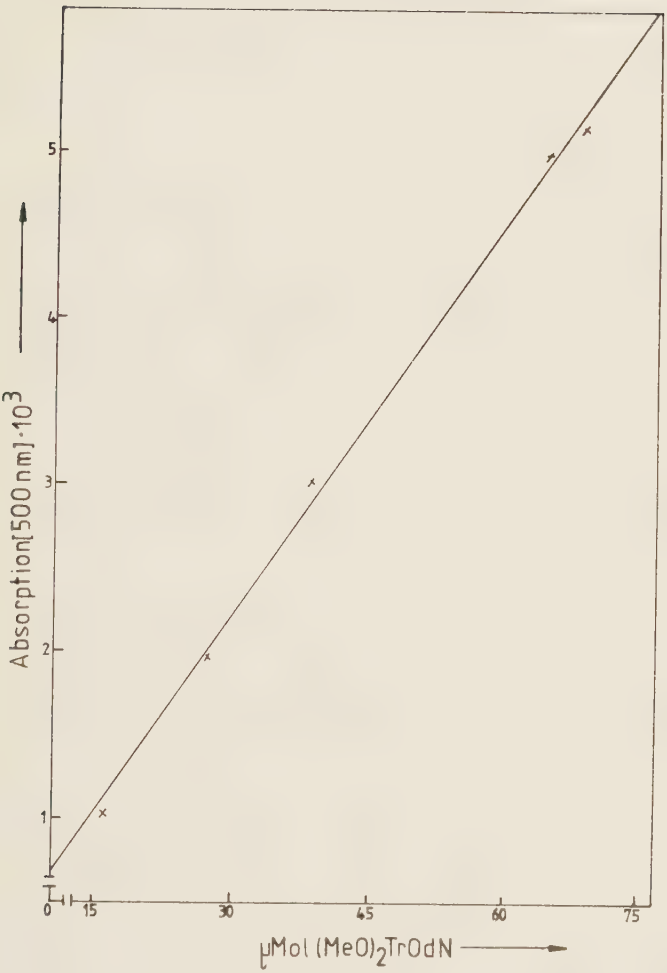


Fig. 19: Eichkurve zur Bestimmung des Reaktionsumsatzes bei den einzelnen Kondensationsschritten der trägergebundenen Oligonucleotidsynthese. Sie wird erhalten durch Detritylierung definierter µMol - Mengen an $(MeO)_2$TrOdN und Messung der Absorption des Tritylkations bei 500 nm in Perchlorsäure/Ethanol 1:1 (v/v).

Das Packen der Trennsäulen erfolgt nach der modifizierten Viskositätsmethode [53]. Die mit HPLC an reverser Phase gereinigten Produkte werden mit Hilfe der Fingerprintmethode vollständig identifiziert.

10.1. Säulenchromatographie an Partisil 10 - SAX

10.1.1. $d(A_4C_4)$ und $d(C_2A_4C_4)$ aus trägergebundener Synthese

Die Chromatographie erfolgt im linear steigenden Gradienten zwischen 0 und 75 % Eluent B mit analytischen Mengen.
Eluent A: 0,001 M KH_2PO_4 in Formamid/Wasser 6:4 (v/v) pH 6,3
Eluent B: 0,3 M KH_2PO_4 in Formamid/Wasser 6:4 (v/v) pH 6,3

10.1.2. $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ aus trägergebundener Synthese

Die Chromatographie erfolgt in präparativen Mengen im linear steigenden Gradienten von 0 % B nach 100 % B in 95 min.
Eluent A: 0,05 M KH_2PO_4
Eluent B: 1,0 M KH_2PO_4
Nach Erreichen von B 100 % wird 65 min lang isokratisch weiter eluiert. Dabei werden alle Fraktionen à 5 ml, die ab 90 % B die Säule verlassen, sowie alle Fraktionen, die bis zur 40. Minute der isokratischen Elution die Säule verlassen haben, gepoolt.

10.2. Chromatographie an reverser Phase mit Nucleosil 7 µm C_{18}

10.2.1. $d(A_4C_4)$ und $d(C_2A_4C_4)$ aus trägergebundener Synthese

Die Chromatographie der analytischen Mengen erfolgt isokratisch mit B 30 %.
Eluent A: 0,01 M NH_4Ac pH 7,5
Eluent B: Methanol/Wasser 6:4 (v/v)
B 30 % bedeutet: Eluent A/Eluent B 7:3 (v/v)

Tab. 16: Bedingungen der HPLC - Trennungen an Nucleosil 7 µm C_{18} und Partisil 10 - SAX

Elutionsprofil Fig. Nr.	Säule Länge x I.D. (mm)	Fluß (ml/min)	Vorschub (mm/min)	Temperatur (° C)	Detection (nm)
2	Nucleosil 250 x 4,6	1,0	2,5	20	254
3	Nucleosil 280 x 8,0*	4,0	2,5	20	254
11, 13	Nucleosil 250 x 4,6	1,0 - 1,2	2,0	20	254
10	Partisil 250 x 4,6	2,0	3,0	50	280
12	Partisil 250 x 4,6	2,0	1,0	60	260

* Vorsäule 30 x 8,0 mm, Säule 250 x 8,0 mm

10.2.2. $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ aus trägerfreier Synthese

Die Elution erfolgt bei den analytischen Trennungen jeweils im linearen Gradienten. Präparative Trennungen werden dagegen teilweise isokratisch durchgeführt (vgl. jeweils Tab. 4).
Eluent A: 0,05 M NH_4Ac pH 7,5
Eluent B: MeOH/0,05 M NH_4Ac pH 7,5 8:2 (v/v)
Gradienten beginnen 3 min nach dem Einspritzen der Substanz. Nach Ablauf des Gradienten wird isokratisch weiter eluiert.

11. Identifizierung der synthetischen Oligonucleosidphosphate

Nicht erwähnte experimentelle Bedingungen sind zusammengefaßt (vgl. Tab. 17).

11.1. Ansatz zur Kinasereaktion:

10 µl Nucleotidlösung ≙ 0,01 A_{260}-Einheiten
6 µl [γ-^{32}P] ATP (3.000 Ci/mMol)
5 µl Kinasepuffer (vgl. D. 1.3.)
1 µl T_4 - Polynucleotidkinase (≙ 3 U)
22 µl

11.2. Homomixe

Die Homomixe V und VI (vgl. Tab. 17) werden wie von Jay [18] beschrieben dargestellt. Homomix 0 wird analog dargestellt, wobei auf die alkalische Hydrolyse ganz verzichtet wurde. Eine andere Darstellung [54] führt zu einem Homomix 0 mit denselben Eigenschaften.

Tab. 17: Bedingungen der enzymatischen Partialhydrolyse von Oligonucleotiden mit Phosphodiesterase aus Schlangengift und der chromatographischen Trennung der Partialhydrolysate

Oligonucleotid Bezeichnung	Counts (cpm)	Phospho-diesterase (µl)	Entnahme des Partialhydrolysats																	Elektro-phorese (min)	(V)	Homo-mix (Nr.)
			(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)	(µl)	(min)			
[^{32}P]d(A_4C_4)	$3x10^5$	4,5	5	2	10	2	15	2	25	3	40	3	60	4	25	4	–	–		15	1000	VI
																				90	2500	
[^{32}P]d($C_2A_4C_4$)	$5x10^5$	5,0	5	1	10	2	15	2	20	3	30	2	40	3	60	2	70	6		60	4000	V
[^{32}P]d($C_4A_4C_4$)	$7x10^5$	6,0	5	2	15	2	30	2	45	4	60	3	90	4	120	5	–	–		75	4000	V
[^{32}P]d($A_4C_4A_4C_4$)	10^6	7,0	5	3	10	2	15	1	30	3	60	3	120	3	180	2	240	4		45	1000	0
																				90	2500	
[^{32}P]d($C_4A_4C_4A_4C_4$)	$2x10^6$	7,5	5	3	10	2	15	1	30	2	60	2	120	3	180	3	240	4		45	1000	0
																				90	2500	

11.3. Partialabbau mit Phosphodiesterase

Die von der DEAE - Platte eluierte Aktivität wird in 20 µl Phosphodiesterasepuffer (vgl. D 1.3.) aufgenommen. 2 µl der Lösung bleiben [illegible] und werden in ein separates Eppendorfgefäß zentrifugiert. Durch Zugabe der Phosphodiesterase beginnt die Partialhydrolyse (Reaktionstemperatur 37° C). Aliquots werden je nach Substanz nach verschiedenen Zeitabschnitten (vgl. Tab. 17) entnommen. Drei in Folge entnommene Aliquots werden in ein gemeinsames Eppendorfgefäß zentrifugiert. Das Eppendorfgefäß wird nach jeder Entnahme 1 min in kochendes Wasser, danach 1 min in flüssigen Stickstoff gehalten. Nach beendeter Partialhydrolyse wird die erzeugte Population von Oligonucleosidphosphaten durch Homochromatographie von Aliquots aus den einzelnen Eppendorfgefäßen untersucht. Eppendorfgefäße, deren Inhalt zum Erhalt einer ausgeglichenen Population notwendig sind werden vereinigt. Das Partialhydrolysat wird eindimensional (Homochromatographie) und zweidimensional (Elektrophorese und Homochromatographie) untersucht.

E. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit werden erstmals die folgenden im terminalen Bereich gengroßer DNA Moleküle hypotricher Ciliaten vorkommenden Teilsequenzen $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ mit der Triestermethode trägerfrei in Mengen von ca. 200 - 250 mg dargestellt. Die trägerfreie Darstellung der obigen Oligonucleosidphosphate erfolgt im wesentlichen mit den für die Triestermethode beschriebenen Techniken. Einige der von uns eingeführten Änderungen verbesserten die Syntheseergebnisse. Es hat sich z. B. als vorteilhaft erwiesen eine Mischung aus TPS und Methylimidazol als Kondensationsmittel nur zur Darstellung von Dinucleosidmonophosphaten und Dinucleotiden zu verwenden, da bei der Synthese längerer Nucleotidblöcke eine Verringerung der Ausbeuten festzustellen ist. Daher wird zur Darstellung von tetrameren und längeren Nucleotidblöcken eine Mischung aus TPS und Tetrazol als Kondensationsmittel benutzt. Die bei den einzelnen Kondensationen (vgl. Tab. 1) erzielten Ausbeuten entsprechen nur bei der Darstellung der dimeren Blöcke mit Cytosin als Basenresten mit 70 - 80 % annähernd Literaturangaben.

Die gleichzeitig trägergebunden durchgeführte Synthese von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ führt allerdings zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen. Anstatt der auch trägergebunden darzustellenden Mengen > 20 mg können nur die in der Literatur für trägergebundene Synthesen üblichen analytischen Mengen isoliert werden. Dennoch kann mit dem Polyvinylsuccinat ein Träger verwendet werden, der zumindest aufgrund der hohen bisher noch nicht beschriebenen Beladbarkeit (max. 730 µMol/g, vgl. Tab. 8) bei gleichbleibend guten Laufeigenschaften einige Voraussetzungen aufweist, die bei Trägern erforderlich sind, mit denen präparative Mengen an Oligonucleotiden darstellbar sind. Diese hohe Beladung wird auf einfachste Weise erreicht, indem $(MeO)_2$TrOdN mit Hilfe von TPS an die Carboxylreste der Trägermatrix kondensiert wird. Dieses von K. Itakura [41] zuerst nur auf Thymidinderivate bei niedriger erreichbarer Beladung (140 µMol/g) angewandte Verfahren kann damit von uns ausgebaut werden.

Während des zum größten Teil blockweisen Aufbaus der Sequenz werden bis auf zwei Kondensationen, deren Umsätze bei ca. 95 % liegen nur Ausbeuten zwischen 30 und 60 % erzielt. Nur 0,15 % des anfangs an

Träger immobilisierten danC werden somit zum Endprodukt $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ verlängert. Es ist damit zu vermuten, daß die anfängliche hohe Beladung des Trägers von ca. 400 µMol/g weitere Kettenverlängerungen sterisch erschwert. Die chromatographische Isolierung von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ aus dem vom Träger abgespaltenen Oligonucleotidgemisch erweist sich im Vergleich zum trägerfrei dargestellten Produkt als schwieriger. Während beim trägerfrei dargestellten Eikosanucleosidphosphat die Auftrennung des erhaltenen Oligonucleotidgemisches nach der Zahl der Ladungen der einzelnen Komponenten an QAE - Sephadex A-25 zu einem aufgelösten Elutionsprofil führt (vgl. Fig. 18 c)) kann das vom Träger abgespaltene komplex zusammengesetzte Oligonucleotidgemisch nach papierchromatographischer Vorreinigung mit Hilfe der HPLC an Partisil 10 - SAX nicht aufgetrennt werden (vgl. Fig. 12). Vor allem die Rechromatographie an Nucleosil 7 C_{18} zeigt, daß bei der trägergebundenen Synthese nur ein äußerst kleiner Teil der nach Reinigung an Partisil erhaltenen A_{260} - Einheiten aus $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ besteht (vgl. Fig. 13). Die Rechromatographie des trägerfrei dargestelltn Eikosanucleosidphosphats an reverser Phase führt aufgrund der schon erzielten Reinheit dagegen nur zur Abtrennung einer geringen Verunreinigung (vgl. Fig. 2 d)) vom einheitlichen Produktpeak. Ein Vergleich der beiden Fingerprints des trägerfrei und trägergebunden dargestellten Eikosanucleosidphosphats (vgl. Fig. 6 und Fig. 16) zeigt, daß im Produkt der trägergebundenen Synthese deutlich mehr Verunreinigungen zu erkennen sind. Es erweist sich damit, daß bei der trägerfreien Synthese die nach jedem Kondensationsschritt durchgeführte zeitaufwendige säulenchromatographische Trennung des Kondensats bei der chromatographischen Isolierung des Endproduktes entscheidende Vorteile mit sich bringt. Weiterhin fällt auf, daß bei der trägergebundenen Synthese sehr viel mehr unspezifische Verunreinigungen abzutrennen sind, die mit [δ-^{32}P] ATP nicht markierbar sind. Es ist deshalb zu vermuten, daß die bis zum Abschluß der Synthese am Träger immobilisierten und blockierten kürzeren Sequenzen bei folgenden Kettenverlängerungen z. T. mit dem Kondensationsmittel auf irgendeine Weise reagieren und die anschließende chromatographische Isolierung des Syntheseprodukts komplizieren. Aufgrund der erzielten Ergebnisse ist damit die säulenchromatographische Reinigung des Kondensats nach jedem Syntheseschritt, somit die trägerfreie Methode der trägergebundenen Synthese vor allem aufgrund chromatographischer Aspekte vorzuziehen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Oligonucleosidphosphate $d(A_4C_4)$, $d(C_4A_4C_4)$, $d(A_4C_4A_4C_4)$ und $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$, die als Teilsequenzen des terminalen Bereichs gengroßer DNA Moleküle von hypotrichen Ciliaten auftreten werden mit der Triestermethode trägerfrei und z. T. auch trägergebunden dargestellt, wobei mit beiden Synthesevarianten präparative Mengen angestrebt werden. Die trägergebundene Synthese von Oligonucleotiden wird an vernetztem Polyvinylsuccinat durchgeführt. Dieser neue Träger erweist sich im Vergleich mit anderen in unserem Labor dargestellten Trägern auf Acrylbasis als am geeignetsten. Die hohe, in der Literatur noch nicht beschriebene Anfangsbeladung ermöglicht die Darstellung präparativer Mengen von Oligonucleotiden. Die Immobilisierung des ersten Bausteins an der Trägermatrix erfolgt nach einem neu entwickelten Verfahren. Nach erfolgter Synthese werden die bei beiden Synthesevarianten erhaltenen Oligonucleotidgemische zuerst säulenchromatographisch an QAE - Sephadex A-25 oder mit HPLC an Partisil 10 - SAX und zuletzt mit HPLC an reverser Phase (Nucleosil 7 C_{18}) aufgetrennt. Die isolierten Produkte werden mit der Fingerprintmethode identifiziert. Präparative Mengen werden nur mit Hilfe der trägerfreien Synthese erzielt, wobei die Oligonucleosidphosphate im 200 - 250 mg Maßstab dargestellt werden. Trägergebunden dargestellte Sequenzen können nur im analytischen Maßstab isoliert werden. Aufgrund der bei der Darstellung von $d(C_4A_4C_4A_4C_4)$ mit beiden Synthesewegen erzielten Ergebnisse werden die Vor- und Nachteile trägerfreier und trägergebundener Synthesen diskutiert.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1) Pfleiderer, W.: Kontakte (Merck) 3 - 13 (1983) 2
2) Kössel, H.; Seliger, H.: Fortschr. Chem. Org. Naturst. 32, 297 (1975) (Herz, W.; Griesbach, H.; Kirby, G. W.; eds) Springer - Verlag, Wien, New York
3) Reese, C. B.: Tetrahedron 34, 3143 (1978)
4) Caruther, M. H. in H. Gassen, A. Lang (eds) Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 71 (1982) Verlag Chemie, Weinheim
5) Gilham, P. T.; Singleton, C. K.; Gough, R. G.: Nucleic Acids Res. 6, 1557 (1979)
6) Jones, S. S.; Raynes, R.; Reese, C. B.; Ubasawa, M.: Tetrahedron 36, 3075 (1980)
7) Takaku, H.; Kamaike, K.; Suetake, M.: Chem. Lett. 111 (1983)
8) Stawinski, J.; Hozumi, T.; Narang, S. A.; Bahl, C. P.; Wu, R.: Nucleic Acids Res. 4, 353 (1977)
9) Catlin, J. C.; Cramer, F.: J. Org. Chem. 38, 245 (1973)
10) Reese, C. B.: Tetrahedron Letters 19, 2727 (1978)
11) Van Boom, J. H. et al.: Rec. Trav. Chim. Pays - Bas 98, 537 (1979)
12) Ohtsuka, E.; Tozuka, Z.; Iwai, S.; Ikehara, M.: Nucleic Acids Res. 10, 6235 (1982)
13) Efimov, V. A.; Reverdatto, S. V.; Chakhmakhcheva, O. G.: Tetrahedron Letters, 961 (1982)
14) Seth, A. K.; Jay, E.: Nucleic Acids Res. 8, 5445 (1980)
15) Itakura, K.; Kaplan, B.: Laboratory Manual, EMBO - Kurs, Darmstadt (1982)
16) Gait, M. J. in H. Gassen; A. Lang (eds) Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 1 (1982) Verlag Chemie, Weinheim
17) Efimov, V. A.; Reverdatto, S. V.: Nucleic Acids Res. 10, 6675 (1982)
18) Jay, E.; Bambara, R.; Padmanabhan, R.; Wu, R.: Nucleic Acids Res. 1, 331 (1974)
19) Schrade, H.: Dissertation, Tübingen (1982)
20) Watzlawick, H.: Dissertation, Tübingen (1980)
21) Gait, M. J.; Sheppard, R. C.: Nucleic Acids Res. 4, 1135 (1977)
22) Gait, M. J.; Sing, M.; Sheppard, R. C.; Edge, M. D.; Greene, A. R., Heathcliffe, G. R.; Atkinson, T. C.; Newton, C. R.; Markham, A. F.: Nucleic Acids Res. 8, 1081 (1980)
23) Gait, M. J.; Duckworth, M. C.; Goelet, P.; Guo Fang Hong; Sing, M.; Titmas, R. C.: Nucleic Acids Res. 9, 1691 (1981)

24) Gait, M. J.; Popov, S. G.; Sing, M.; Titmas, R. C.: Nucleic Acids Res., Symp. Series, 7, 243 (1980)
25) Crea, R.; Horn, T.: Nucleic Acids Res. 8, 2331 (1980)
26) Gough, R. G.; Brunden, M. J.; Gilham, P. T.: Tetrahedron Letters 22, 4177 (1981)
27) Kohli, V.; Balland, A.; Winzerith, M.; Sauerwald, R.; Staub, A.; Lecocq, J. P.: Nucleic Acids Res. 10, 7439 (1982)
28) Itakura, K.; Ito, H.; Ike, Y.; Ikuta, S.: Nucleic Acids Res. 10, 1755 (1982
29) Belagaye, R.; Brush, C. K.: Nucleic Acids Res. 10, 6295 (1982)
30) Norris, K.; Norris, F.; Brundfeldt, K.: Nucleic Acids Res., Symp. Series, 7, 233 (1980)
31) Miyoshi, K.; Arentzen, R.; Huang, T.; Itakura, K.: Nucleic Acids Res. 8, 5507 (1980)
32) Dembek, P.; Miyoshi, K.; Itakura, K.: J. Am. Chem. Soc. 103, 706 (1981)
33) Ohtsuka, E.; Takashima, H.; Ikehara, M.: Tetrahedron Letters 22, 765, (1981)
34) Gait, M. J.; Arshady, R.; Atherton, E.; Lee, K.; Sheppard, R. C.: J. Chem. Soc., Chem. Commun, 423 (1979)
35) Gait, M. J.; Matthes, H. W. D.; Sing, M.; Sproad, B. S.; Titmas, R. C.: Nucleic Acids Res. 10, 6243 (1982)
36) Gait, M. J.: Laboratory Manual, EMBO - Kurs, Darmstadt (1982)
37) Herrn Prof. Dr. Schott danke ich für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten Träger.
38) Heitz, W.; Bier, P.: Makromol. Chem. 176, 657 (1975)
39) Ruess, H.: Diplomarbeit, Tübingen (1981)
40) Miyoshi, K.; Huang, T.; Itakura, K.: Nucleic Acids Res. 8, 2331 (1980)
41) Miyoshi, K.; Miyake, T.; Hozumi, T.; Itakura, K.: Nucleic Acids Res. 8, 5473 (1980)
42) Heitmann, U.: Diplomarbeit, Tübingen (1975)
43) Itakura, K.; Miyoshi, K.: Tetrahedron Letters 20, 3635 (1979)

44) Semmler, R.: Dissertation, Tübingen
45) Organikum 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, DDR, 623 (1977)
46) Khorana, H. G.: J. Am. Chem. Soc. 88, 823 (1966)
47) Mihina, J. S.; Herbst, R. M.: J. Org. Chem. 15, 1082 (1956)

48) Bunton, C. A.; Ihara, Y.: J. Org. Chem. 42, 2865 (1977)

49) Organic Synthesis, Collective Volume II, 560

50) Maguire, M. H.; Shaw, G.: J. Chem. Soc., 1479 (1953)

51) Organikum 15. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, DDR, 528 (1977)

52) ibid. 461

53) Firmenschrift: HPLC - Füllrohr, Machery - Nagel, Düren (1977)

54) Frank, R.; Blöcker, H. in H. Gassen; A. Lang (eds) Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, 225 (1982) Verlag Chemie, Weinheim

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, H. Eckstein, G. Gauglitz, G. Häfelinger, H. P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, U. Kunze, D. Krug, P. Kraus, E. Lindner, I. P. Lorenz, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rundel, H. Schott, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Heinz Anton Rueß, geboren am 14. Juli 1955 in Sigmaringen.
Sohn des Bahnbeamten Martin Rueß und seiner Ehefrau Walburga
geb. Buzengeiger.

1962 - 1966	Grundschule in Sigmaringen
1966 - 1974	Staatl. Gymnasium Sigmaringen
Juni 1974	Reifeprüfung
Juli 1974 - Sept. 1975	Wehrdienst
Okt. 1975	Immatrikulation für Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Dez. 1978	Abschluß des Vordiploms
März 1981	Mündliche Diplomprüfung
April 1981 - Sept. 1981	Diplomarbeit "Versuche zur Festphasensynthese von Oligodesoxyribonucleotiden an vernetzten Polyacrylsäureträgern"
Okt. 1981 - Sept. 1983	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Schott "Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden nach der Triestermethode. Darstellung von Teilsequenzen des terminalen Bereichs gengroßer DNA Moleküle von hypotrichen Ciliaten"
20. Juni 1980	Eheschließung mit Anneliese geb. Fries